



Hinc patriam sustinet

Instituto Superior de Agronomia
Universidade Técnica de Lisboa



**Luta contra *Varroa destructor* Anderson & trueman:
avaliação de estratégias biotécnicas e bioquímicas com
o óleo de *Mentha cervina* L.**

Carlos Manuel Relva da Silva

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia florestal e dos Recursos Naturais

Orientadora: Doutora Manuela Rodrigues Branco Simões

Co-orientadora: Mestre Joana Godinho

Júri:

Presidente: Doutora Ana Maria da Silva Monteiro, Professora Auxiliar do
Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

Vogais: Doutora Generosa Maria Manso Teixeira Xavier, Professora Auxiliar da
Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa

Doutora Margarida Gomes Moldão Martins, Professora Auxiliar do Instituto
Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa

Doutora Manuela Rodrigues Branco Simões, Professora Auxiliar do Instituto
Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa

Lisboa 2010

Errata:

No título onde se lê Anderson & trueman,
deve ler-se Anderson & Trueman e ainda
no título onde se lê óleo deve-se ler óleo essencial!

Agradecimentos

Quero agradecer à Professora Manuela Branco do Instituto Superior de Agronomia, minha orientadora, pela orientação deste trabalho, pela sua disponibilidade, pelos seus ensinamentos e instruções muitos úteis e construtivas ao longo do trabalho.

Agradecer à minha família, aos meus pais e irmão, pelo esforço, pelo apoio e pelo facto de terem acreditado que este projecto seria possível. À minha prima Elisabete no apoio e ajuda a quando da minha chegada a Lisboa e durante estes anos que por cá ando.

À Eng.^a Joana Godinho, responsável pelo Posto Apícola, pela disponibilidade e cooperação ao permitir que parte deste trabalho fosse desenvolvido no posto Apícola.

Ao Eng.º Nuno Costa não posso deixar de agradecer os seus ensinamentos sobre apicultura, a sua amizade ao longo destes cinco anos que por cá andei e a ajuda dada na realização do trabalho.

À minha namorada Carina agradeço a sua amizade, o seu apoio nas horas menos boas, a sua compreensão pelas horas que não passámos juntos para que fosse possível a realização deste trabalho e por toda a ajuda prestada quer no trabalho quer ao longo do curso.

Ao meu grupo de amigos: às duas Anas, aos dois Diogos e ao Paulo por todos os momentos que passámos juntos. Aos outros amigos que vieram ao longo do curso: Ricardo, Cláudia, Marco, Miguel, Hugo e Fernanda um bem-haja.

Às pessoas que de alguma forma colaboraram na realização deste trabalho o meu agradecimento, Eng.^a Leandra, Eng.^a Cláudia, ao Eng.º Saraiva e à professora Margarida Moldão que foi muito prestável na parte dos óleos quer na extracção quer no encapsulamento, ao Professor Jorge Cadima pela disponibilidade e orientação no tratamento dos dados.

Um agradecimento a todos os outros que ao longo destes cinco anos contribuíram para a minha aprendizagem e enriquecimento pessoal: professores, colegas e demais pessoas.

Resumo

A *Varroa destructor* Anderson & Trueman é um parasita da abelha *Apis mellifera* L., originário da Ásia, relativamente recente na Europa e noutros continentes. Como espécie invasora tem causado muitas perdas na apicultura em todo o mundo. Este trabalho teve dois objectivos principais. Numa primeira parte, procura-se testar o efeito da ausência de rainha com actividade de postura, na eficácia do tratamento químico contra a varroa, procurando-se verificar se esta forma de luta biotécnica integrada com tratamento químico, pode ser utilizada pelos apicultores com mais valias no controlo da varroa. Na segunda parte do trabalho, foram efectuados ensaios com extracto de óleo essencial de *Mentha cervina* L. em laboratório, para verificar se este tem efeito acaricida sobre a varroa. Utilizaram-se dois métodos de aplicação do extracto: i) directamente sobre uma esponja, expondo-se as varroas ao contacto com os voláteis, e ii) encapsulados, numa matriz de amido, para que os voláteis se libertem de forma mais gradual. Em cada um dos tratamentos atrás descritos foram testadas diferentes doses. A exclusão da rainha nas colónias permitiu um aumento significativo da eficácia do tratamento químico. No entanto, houve uma grande variabilidade entre colónias, e algumas colónias correram o risco de ficar orfanizadas, o que compromete a viabilidade do método. O óleo essencial de *Mentha cervina* teve uma acção letal sobre a varroa, evidenciada pelos dois métodos, variando os resultados, após 2 horas de exposição ao óleo essencial, entre 70% a 95% de mortalidade consoante os métodos e as doses. O encapsulado mostrou ser mais eficaz que a libertação a partir de esponja. Doses intermédias mostraram ser suficientes, pelo contrário as doses mais elevadas mostraram um efeito letal também sobre as abelhas. Registou-se ainda que os compostos voláteis libertados após cerca de 30 a 60 minutos de exposição na esponja tinham um efeito acaricida mais elevado.

Palavras-chave: Varroa; Abelhas; Óleo essencial; *Mentha cervina*; Luta biotécnica.

Abstract

Varroa destructor Anderson & Trueman is a parasitic mite of the honeybee *Apis mellifera* L. This species is originated from Asia, being invasive in Europe and other regions, where it causes heavy losses to beekeeping. In this work we have two main objectives: In the first part, the effect of excluding the queen's egg-laying activity as a biotechnical control measure integrated with the chemical treatment against varroa is tested. In the second part of the study, laboratory trials were conducted using essential oil extracts of *Mentha cervina* L. to test its acaricide effect on the varroa. Two application methods were used, with direct application of the oil in a sponge allowing the varroa mites to contact the volatiles, and by through oil encapsulation in order to release volatiles more gradually. Different doses were tested on both methods. The exclusion of the queen in the colonies led to a significant increase in the efficacy of the chemical treatment. However, there was great variability between colonies, and some colonies ran the risk of getting orphaned, which undermines the viability of the method. The essential oil of *Mentha cervina* had a lethal action on the varroa, evidenced by both methods. Mortality after 2 hours of exposition to volatiles varied between 70% and 95%, varying with the dose and method. Encapsulation revealed better results expressed in mite mortality. Intermediate doses were shown to be sufficient, on the contrary the higher doses showed a lethal effect on bees also. Further, it was recorded that the volatiles released after about 30 to 60 minutes of exposure in the sponge had a higher acaricidal effect, suggesting that the monoterpenes with higher molecular weight, are probably the most relevant affecting the varroa mite.

Keywords: Varroa; Bees; Essential oil; *Mentha cervina*; Biotechnical control

Extended abstract

The varroa mite *Varroa destructor* Anderson & Trueman is a major problem worldwide for honeybees and apiculture activity, leading many colonies to death, and causing large economic losses. This parasite is an invasive species originate from Asia, relatively new in the European honeybee *Apis mellifera* L., which explains why this bee has no ways to defend itself against the mite. Control strategies available are mostly chemical and not completely effective which justifies the ongoing research to develop more effective, ecological sound and food safety strategies. This work is divided into two parts. In the first part we aim at testing the effect of a biotechnical technique, the removal of the queen from the colony during the chemical treatment, on the efficacy of the treatment against the mite. Sixteen colonies of bees were randomly assigned into two groups of 8 colonies. One group was selected to keep the queen; the other was selected to remove the queen previously to chemical treatment. All colonies were treated with Bayvarol during 56 days. All the hives were modified with a wire mesh on the bottom with a tray bellow which allowed the collection and counting of the mites. The collection of mites started about two weeks before treatment and lasted for two weeks after treatment. The brood areas of the colonies before and after the treatment were quantified.

The results show significant differences in the evolution of mites between the two groups of colonies during the trial, and that the populations of mites at the end of the test was significantly higher on the colonies with queen in comparison with the colonies without queen. Other intrinsic and extrinsic factors affecting the mortality of the mites during the test were assessed, in particular the environmental variables temperature and hours of sun were found significant to explain the mortality of the mites.

In the second part of this study we aim was testing the efficacy of the essential oil of *Mentha cervina* L. on varroa. The oil was tested in the laboratory in plastic boxes, with varroas previously captured alive in colonies of infected bees. Two different ways of application of the oils were tested, i) volatiles releasing from a sponge, and ii) volatiles releasing from encapsulated oil in an amide matrix. An additional test was conducted to analyze at what moments in time were the compounds, released from the sponge, causing higher mortality in the varroas. A significant mortality effect on the varroa mites was found with both methods, the mortality rate ranged from 70% to above 95%,

for different doses of encapsulation. For the oils released from the sponges, the death rate was slightly lower, between 70% and 80%, with no differences in mortality rates for the different doses used. Volatile compounds releasing between 30 and 60 minutes after application in the sponge mostly affected the varroa. The results are encouraging but further trials are needed to assess the potential use of the essential oil in the colonies to control varroa.

Índice

Agradecimentos	i
Resumo	ii
Abstract	iii
Extended abstract	iv
Índice de Figuras	viii
Índice de Quadros	ix
Índice de Anexos	x

1. Introdução	1
1.1 Enquadramento do tema	1
1.2 Biologia de <i>Varroa destructor</i>	3
1.3. Sintomas e patologia	5
1.4 Métodos de diagnóstico	7
1.5. Controlo da varroose	9
1.5.1 Compostos de síntese química	9
1.5.2. Compostos químicos naturais	10
1.5.3 Métodos biotecnológicos, genéticos e biológicos	11
2. Parte I: Exclusão da rainha como estratégia biotécnica	13
2.1 Fundamento biológico	13
2.2 Material e Métodos	15
2.2.1. Delineamento experimental e método de amostragem	16
2.2.2. Estimativa da área de postura	17
2.2.3. Dados meteorológicos	18
2.2.4 Dificuldades verificadas	19
2.2.5 Análise de dados	19
2.3. Resultados	21
2.3.1 Verificação de alguns pressupostos iniciais	21
2.3.2. Evolução da população de <i>Varroa destructor</i>	23
2.3.3 Modelo de regressão múltipla	25
2.3.4 População final da Varroa e área de cria	27
2.4. Discussão	28
3. Parte II: Óleo essencial de <i>Mentha cervina</i>	31
3.1 Introdução	31
3.2 Encapsulamento	34
3.3 Efeito insecticida e acaricida dos óleos essenciais	35
3.4 Material e métodos	38
3.4.1 Óleo essencial de <i>Mentha cervina</i>	38
3.4.2 Captura das Varroas	39
3.4.3 Experiência 1: Óleo essencial de <i>Mentha cervina</i> em esponja	40
3.4.4 Experiência 2: Volatilização do óleo essencial de <i>Mentha cervina</i>	41
3.4.5 Encapsulamento	42
3.4.6 Experiência 3: Óleo essencial de <i>Mentha cervina</i> encapsulado	42
3.4.7 Tratamento dos dados	43

3.4.8 Dificuldades encontradas na realização prática deste trabalho	44
3.5. Resultados.....	45
3.5.1 Ensaio 1 com o óleo essencial em esponja	45
3.5.2 Tempo de volatilização do óleo essencial	47
3.5.3 Ensaio com o óleo essencial encapsulado	49
3.6. Discussão	51
4. Conclusões.....	54
5. Referências bibliográficas	57
6. Anexos	64
6.1. Anexo 1	64
6.2. Anexo II.....	70

Índice de figuras

Figura 1	Abelha	1
Figura 2	Abelha parasitada por varroas	2
Figura 3	Varroa fêmea	3
Figura 4	Colmeia de <i>Apis mellifera</i>	5
Figura 5	Zangão juvenil com sintomas de varroose	6
Figura 6	Tabuleiros utilizados na recolha da varroa durante o ensaio	16
Figura 7	Tabuleiro utilizado na recolha dos ácaros de varroa	17
Figura 8	Suporte utilizado para tirar as fotos aos quadros	17
Figura 9	Temperaturas médias e a insolação média para cada período de contagem, durante o ensaio	18
Figura 10	Precipitação acumulada (mm) entre cada contagem, para o ensaio	18
Figura 11	Foto com a área de cria	21
Figura 12	Área de postura no início do ensaio e no final para todas as colónias	22
Figura 13	Média das áreas de postura para os dois grupos de colónias nas duas fases do ensaio	22
Figura 14	Percentagens acumulada de ácaros mortos nas colónias com rainha, ao longo do ensaio. O tratamento químico teve início no dia 14	23
Figura 15	Percentagens acumulada de ácaros mortos nas colónias sem rainha, ao longo do ensaio. O tratamento químico teve início no dia 14	23
Figura 16	Médias (\pm ep) das percentagens acumuladas de morte das varroas para as duas modalidades, com e sem rainha	25
Figura 17	Box-plot dos valores de queda de varroa estimados pelo modelo em função da variável rainha	26
Figura 18	Relação entre a queda percentual de varroa (y) e a temperatura média	26
Figura 19	Relação entre a queda percentual de varroa (y) e a insolação	27
Figura 20	Esquema da produção do pirofosfato isopentenil (isopreno) estrutura base da formação dos terpenos, a partir do metabolismo primário das plantas	33
Figura 21	Extracção do óleo essencial de <i>Mentha cervina</i> em destilação por vapor	38
Figura 22	Pupa de zangão com varroas	39
Figura 23	Esponja utilizada no ensaio com o óleo essencial	39
Figura 24	Caixas utilizadas na realização dos ensaios	40
Figura 25	Foto de uma das caixas do ensaio da volatilização vista de cima	41
Figura 26	Frasco de recolha e acondicionamento do encapsulado	42

Figura 27	Encapsulado e dois zangãos no ensaio com o óleo essencial encapsulado	42
Figura 28	Zangão transportando uma varroa e ao canto mais duas varroas	43
Figura 29	Foto das caixas no ensaio com o óleo essencial	45
Figura 30	Tempo médio (minutos) de sobrevivência (\pm e.p.) da varroa após ter sido aplicado o óleo essencial. Barras com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0.05$).	45
Figura 31	Taxa média de sobrevivência (\pm e.p.) ao fim de 65 minutos após a aplicação do óleo essencial de <i>Mentha cervina</i> . Barras com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0.05$)	46
Figura 32	Percentagem média de sobrevivência (\pm e.p.) da varroa ao longo do tempo e o desvio padrão, no ensaio com o óleo essencial de <i>Mentha cervina</i>	46
Figura 33	Percentagem média (\pm e.p.) de sobrevivência nos diferentes tempos de libertação dos compostos. Caixa 1: 0-15 minutos; Caixa 2: 15-30 minutos; Caixa 3: 30-45 minutos; Caixa 4: 45-60 minutos; Caixa 6: 75-90 minutos	48
Figura 34	Tempo (minutos) médio (\pm e.p.) de sobrevivência da varroa no ensaio com o encapsulado. Barras com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0.05$)	49
Figura 35	Taxa média de sobrevivência (\pm e.p.) de varroas aos 65 minutos no ensaio com o óleo essencial encapsulado. Barras com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0.05$)	49
Figura 36	Taxas de sobrevivência para as diferentes doses de encapsulado utilizado no ensaio	50
Figura 37	Recipiente com óleo essencial de <i>Mentha cervina</i>	51

Índice de Quadros

Quadro 1	Resultados do teste de Log-Rank (Mantel-Cox) para a comparação entre tratamentos no ensaio do óleo essencial de <i>Mentha cervina</i>	47
Quadro 2	Composição do óleo essencial de <i>Mentha cervina</i>	48
Quadro 3	Estatística do teste de Log-Rank e a comparação entre tratamentos, para o ensaio com o óleo essencial encapsulado	50

Índice de Anexos

Anexo 1.1	Dados referentes à contagem da queda de varroa durante todo o ensaio	64
Anexo 1.2	Distribuição das colmeias nas duas modalidades	65
Anexo 1.3	Dados das contagens da queda de varroa, acumulados ao longo do ensaio	65
Anexo 1.4	Total de queda e total da População de varroa por colmeia	65
Anexo 1.5	Dados meteorológicos com maior interesse para o ensaio, no período referente à realização	66
Anexo 1.6	Resultados obtidos no programa R	66
Anexo 1.6.1	Resultados do modelo hierarquizado	66
Anexo 1.6.2	Médias do ensaio	66
Anexo 1.6.3	Dados do modelo completo	67
Anexo 1.6.4	Dados do modelo simples	67
Anexo 1.6.5	Gráfico dos Resíduos vs valores Estimados	68
Anexo 1.6.6	Gráfico da Normalidade dos resíduos	68
Anexo 1.6.7	Gráfico dos resíduos estandardizados e distâncias de Cook's	69
Anexo 2.1	Dados do ensaio com o óleo essencial de <i>Mentha cervina</i> , número de varroas mortas ao longo do tempo	70
Anexo 2.2	Taxa de sobrevivência do ensaio com o óleo essencial de <i>Mentha cervina</i>	70
Anexo 2.3	Taxas de sobrevivência no ensaio com o óleo essencial, nos diferentes grupos	71
Anexo 2.4	Taxa média de sobrevivência da varroa nos grupos do ensaio com o óleo essencial	71
Anexo 2.5	As médias e medianas para a sobrevivência da varroa no tempo em cada tratamento	72
Anexo 2.6	Resultados do ensaio de volatilização	72
Anexo 2.7	Taxas de sobrevivência no ensaio da volatilização	72
Anexo 2.8	Taxa de sobrevivência da varroa ao longo do tempo em cada uma das caixas, após exposição com o óleo essencial	73
Anexo 2.9	As médias e medianas para a sobrevivência da varroa no tempo para cada tratamento	73
Anexo 2.10	Estatística do teste de Log-Rank e a comparação entre tratamentos, para o ensaio de volatilização	73
Anexo 2.11	Grupos e a quantidade de encapsulado por grupo	74
Anexo 2.12	Resultados obtidos no ensaio com o óleo encapsulado, número de varroas mortas ao longo do tempo, em cada grupo	74
Anexo 2.13	Taxa de sobrevivência da varroa por caixa, ao longo do tempo	75
Anexo 2.14	Taxas de sobrevivência ao longo do tempo para cada grupo	76
Anexo 2.15	Taxa média de sobrevivência da varroa para cada um dos tratamentos, ao longo do tempo	76
Anexo 2.16	Médias e Medianas para a sobrevivência da varroa no tempo para cada tratamento, no ensaio com o óleo essencial encapsulado	77

If the bee disappears from the surface of the earth, man would have no more than four years to live. No more bees, no more pollination ... no more men!" Albert Einstein

1. Introdução

1.1 Enquadramento do tema

A abelha, *Apis mellifera* L. (Figura 1) é um insecto social, que vive em colónias



Figura 1: Abelha; Fonte: autor

organizadas por castas: a rainha, dezenas de milhares de obreiras e centenas de zangãos. A colónia aloja-se durante a maior parte do tempo em abrigos que encontra na natureza ou disponibilizados pelo homem (Jean-Prost, 1995).

Desde a pré-história que existem relatos do uso dos produtos apícolas por parte do homem. O saque das colónias de abelhas selvagens ocorreu ao longo de milénios, até que começaram a criar as colónias de abelhas de forma empírica dentro de recipientes de vários tipos. No entanto, só depois da invenção da colmeia mobilista, isto é com quadros móveis, em 1851, é que surgiu a apicultura moderna. Na

actualidade, a abelha e a apicultura ganham uma importância crescente, não só pelos seus produtos, mas pelo serviço de polinização que presta a uma ampla gama de ecossistemas terrestres, contribuindo decisivamente para o sucesso de diversas culturas, assim como para a transferência de genes em plantas não cultivadas em ambientes naturais (Murilhas, 2007; Madeira, 2008).

Em Portugal, em 2007, existiam cerca de 15 mil apicultores registados, com um universo aproximado de 33 mil apiários e 555 mil colmeias. A maior parte dos apicultores são pequenos ou muito pequenos. A taxa de profissionalização do sector é extremamente reduzida; a dimensão média em Portugal é de 36 colmeias por apicultor. Os apicultores não profissionais, no conjunto, representam 95,9% do total de apicultores, mas detêm 59,6% do total de colmeias, com dimensão média de 22,6 colmeias por apicultor. Os apicultores profissionais representam apenas 4,1%, mas apresentam uma dimensão média de 358 colmeias por apicultor (Programa Apícola Nacional, 2007). Embora, o número médio de colónias por km², de cerca de 6, seja um dos maiores da Europa, a estrutura do sector, com uma percentagem expressiva de

pequenos apicultores não profissionalizados, dificulta a inovação e adaptação a novas exigências, em particular aos factores que ameaçam as colónias de abelhas.

As abelhas estão sujeitas a uma série de inimigos naturais e de doenças, que levam ao declínio da população e muitas vezes à morte das colónias. Das doenças com maior impacto na actividade apícola destacam-se: Varroose, Loque Americana, Ascosferiose, Acariose e Nosemose (Hooper, 1976; Martinho, 1988; Jean-Prost, 1995).

O fenómeno de morte em massa de colónias de abelhas, vulgarmente conhecido como *Colony Collapse Disorder*, foi observado pela primeira vez em 2006 nos Estados Unidos da América, mas é actualmente considerado um problema global, sendo que na Europa os principais países afectados são Portugal, Espanha, França e Alemanha (Alves, 2009). Segundo Gilles Ratia, Presidente da APIMONDIA, a apicultura na Europa poderá desaparecer em menos de uma década, porque as abelhas estão a ser vítimas de vários riscos, em particular doenças, insecticidas e uma agricultura intensiva, afirmando: “Com este nível de mortalidade os apicultores europeus só podem sobreviver outros 8 ou 10 anos. Temos tido grandes problemas no sudoeste da França durante os últimos anos, mas agora também na Itália e Alemanha”. No ano passado, cerca de 30 % das cerca de 13,6 milhões de colónias que existem na Europa morreram, segundo dados da APIMONDIA. Na Eslovénia, as perdas chegaram aos 50%, enquanto na Alemanha foram de 80% (Fnep, 2010). Estas perdas, no seu conjunto põem em causa a polinização de 35% das culturas alimentares europeias (Fnep, 2010).

Existe um consenso entre a comunidade científica que se trata de um fenómeno multifactorial que leva à perda de colónias de abelhas na Europa e nos Estados Unidos com destaque para os insecticidas e a varroose (Hendriks *et al.* 2009). Uma vez debilitadas, por estes agentes, as colónias são dizimadas por vírus e outras doenças.

A varroose é uma doença parasitária causada por um ácaro externo (Figura 2), *Varroa destructor* Anderson & Trueman (Acari: Varroidae). Este parasita é considerado o maior problema sanitário da apicultura actual (Teixeira, 1988),



Figura 2: Abelha parasitada por varroas; Fonte: autor



Figura 3: Varroa fêmea;

Fonte: autor

causando graves perdas ao nível das abelhas, das colónias, da produtividade dos apiários e da economia do sector apícola. Inicialmente identificado como *V. jacobsoni*, só recentemente foi classificado, por análise de DNA mitocondrial, como *Varroa destructor* (Figura 3) (Anderson & Trueman, 2000). Este ácaro tem origem na Ásia onde coexiste com o seu hospedeiro natural *Apis cerana* Fabr. (Anderson & Trueman, 2000). A varroa foi vista pela primeira vez sobre a abelha *Apis mellifera* no ano de 1959 no Sudeste Asiático.

No entanto, décadas depois de ter mudado de hospedeiro, continua a ser letal para a generalidade das colónias não tratadas (Murilhas, 2007). Em Portugal, foi encontrada pela primeira vez em 1987, na região de Entre o Douro e Minho, e rapidamente se disseminou por todo o país provocando a morte a inúmeras colónias logo nos primeiros anos (Vieira & Branco, 1992).

Continuando a ser fundamental e actual o desenvolvimento de estratégias eficazes e sustentáveis ao controlo da varroose, neste trabalho visa-se procurar estratégias de controlo que permitam otimizar ou substituir os métodos existentes. Numa primeira parte visa-se testar a eficácia de uma estratégia de luta biotécnica integrada com luta química de modo a otimizar os resultados. Na segunda parte do trabalho tem-se como objectivo testar os óleos essenciais de *Mentha cervina* L. (hortelã-da-ribeira, poejo-fino ou erva-peixeira), e o seu efeito acaricida sobre a varroa, em diferentes formas de aplicação.

1.2 Biologia de *Varroa destructor*

Varroa destructor é um ácaro visível a olho nu, de 1 a 2mm de diâmetro, com o corpo elipsoidal globoso. Distingue-se de outros artrópodes que também podem ocorrer sobre as abelhas, em particular do díptero *Braula caeca*, por apresentar 4 pares de patas (Teixeira, 1988). Nesta espécie existe um acentuado dimorfismo sexual, os machos são mais arredondados, com menos de 1mm de diâmetro, de cor branca ou acinzentando

claro, as fêmeas têm forma oval, de 1,5 a 2mm na sua largura máxima, de cor castanho claro ou escuro. A armadura bucal das fêmeas consiste num dispositivo picador-sugador que permite perfurar o revestimento quitinoso das abelhas e sugar a hemolinfa, o que provoca debilidade, reduz a actividade e longevidade das abelhas (Rosenkranz *et al.* 2009). Secundariamente, a perfuração da quitina abre a barreira que protege o insecto contra: bactérias, vírus e outros agentes patogénicos. Esta acção, conjugada com o rápido crescimento da população de ácaros, conduz no curto prazo a diminuição da longevidade das abelhas e ao colapso das colónias (Vieira & Branco, 1992).

O ciclo de vida da varroa está dividido em duas fases distintas, a fase de desenvolvimento e reprodução, que se completa dentro dos alvéolos de criação das abelhas e que vai de 8 a 9 dias desde ovo, larva, ninfa a adulto, mais 5 dias de maturação sexual, e a fase forética, em que os adultos se alimentam sobre as abelhas, sem se reproduzirem. Nesta altura, as fêmeas já estão prontas a se reproduzir, mas todavia só o fazem quando encontram um alvéolo com larva em fase de desenvolvimento apropriada. As varroas fêmeas podem viver até 10 dias sobre as paredes da colmeia e fora desta podem viver desde algumas horas até 9 dias (Jean-Prost, 1995). Testes efectuados com a varroa demonstraram que estas preferem temperaturas entre os 26 e os 33°C, o que é ligeiramente inferior à temperatura a que se encontram as larvas, 34,5 a 35,5°C (Rosenkranz *et al.* 2009). O desenvolvimento e reprodução da varroa tem lugar nas células de criação das abelhas, quer de zangãos, quer de obreiras. Penetram nos alvéolos quando as larvas têm de cinco a seis dias de idade, e já estão prestes a ser operculadas. Quando o alvéolo é tapado, os ácaros alimentam-se da hemolinfa das pupas e fazem a postura na parede das células (Martinho, 1988). As varroas entram, para dentro das células de cria de abelha para se reproduzirem, existindo uma dependência entre a reprodução dos ácaros e as células de cria disponíveis (Fuchs & Langembach, 1989). O período de duração da fase de pupa nos zangãos é maior do que nas obreiras. Como tal, permite que quatro a cinco varroas possam chegar à fase adulta nas células de zangão enquanto que nas células de cria de obreira apenas 2 a 3 varroas se tornam adultas.

As varroas fêmeas preferem invadir as células com larvas que se encontram na periferia, o que se justifica pelo seu preferencial térmico, dado que estas zonas têm uma temperatura de cerca de 1°C inferior à do centro. As células de cria de zangão são mais afectadas do que a cria de obreira (Kuenen & Calderone, 1999), uma das razões apontadas é o facto das larvas de zangão, em comparação com as larvas de obreira,

libertarem uma quantidade maior de feromona, que atrai as varroas em maior número (Martin *et al.* 2001). Outra justificação reside no facto das larvas de zangão serem alimentadas em maior quantidade que as larvas de obreira, pelo que as abelhas amas visitam mais vezes as células de zangão, o que aumenta a probabilidade de infecção, dado que estas abelhas são vectores de transporte das varroas até às células de cria (Rosenkranz *et al.* 2009). Existem outros factores que são importantes na preferência das varroas pelas larvas de zangão; um é o facto de a duração do ciclo de reprodução ser 3 dias mais longo nos zângãos e o outro é que a massa corporal das larvas de zangão é muito maior do que a das obreiras, permitindo alimentar muito mais varroas.

Apenas as fêmeas adultas parasitam as abelhas, as formas imaturas e os machos do ácaro morrem pouco tempo depois da desoperculação das células. O crescimento da população de varroa está, fortemente dependente da actividade de postura da colónia, dado que este depende da criação de abelhas para se reproduzir. Assim, os factores que afectam a actividade de postura da rainha influenciam, indirectamente o crescimento da população do parasita (Wilkinson & Smith, 2002).

1.3. Sintomas e patologia



Figura 4: Colmeia de *Apis mellifera*;

Fonte: autor

Nas colónias (Figura 4) em que a população de varroa é pequena, em relação à população de abelhas, os ácaros passam despercebidos pela falta de efeitos visíveis. Nesta fase da infecção a sua detecção só é possível por métodos mais precisos, métodos laboratoriais ou pela contagem das varroas em tabuleiros de recolha. Só na fase seguinte, em que a infecção já está adiantada, os sintomas são visíveis nas abelhas e na criação, sendo possível observar facilmente as próprias varroas sobre as abelhas. Nesta fase, todavia, é necessário aplicar um medicamento eficaz o mais rápido possível e já dificilmente a colónia sobreviverá. Nos danos causados pela varroa podem-se distinguir os de acção directa e indirecta. Por acções directas incluiu-se a perda de vigor, deformações anatómico-morfológicas e mortalidade das abelhas. Quando a infecção dos ácaros na colmeia é muito alta, as

abelhas emergentes apresentam diferentes tipos de deformação física, como asas deformadas, abdómen encurtado e em forma de pião, patas mais curtas e o corpo mais pequeno (Figura 5). Outros efeitos directos são a diminuição do peso, da longevidade das abelhas, da capacidade de trabalho e alteração do comportamento (Hoyo & Cabrera, 2004). Nos danos de acção indirecta causados pela varroa sobre as abelhas observa-se a inoculação de vírus e bactérias nas abelhas levando ao aumento da mortalidade destas. Por exemplo, foi demonstrada a capacidade da varroa em transportar os esporos da bactéria, *Paenibacillus larvae*, agente causador da loque americana (Hoyo & Cabrera, 2004).



Figura 5: Zangão juvenil com sintomas de varroose; Fonte: autor

Como acções indirectas incluem-se ainda os prejuízos económicos, como os resultantes das perdas de produção de mel, aumento de cuidados de manejo e substituição das colónias mortas pelas varroas entre outros serviços. De acordo com o limiar mínimo de prejuízos económicos, as colónias devem ser tratadas, quando o nível de infestação for de tal ordem que os prejuízos económicos justificam o tratamento (Hoyo & Cabrera, 2004).

O tratamento contra a varroa no fim da estação fria leva à redução do nível de infestação da varroa. Durante a Primavera a taxa de multiplicação das abelhas é largamente superior à do ácaro. No entanto, a taxa de reprodução das abelhas na Primavera é muito grande, assim a área de cria aumenta, havendo um maior número de células de cria disponíveis para a reprodução das varroas, de tal forma que o aumento da varroa durante este período é muito grande. Porém, quando o fluxo do néctar e de pólen

começa a diminuir a rainha automaticamente diminui a postura, por vezes drasticamente. Nessa altura a incidência das varroas é máxima o que tem como consequência o aumento da relação varroas/larvas das abelhas, conduzindo rapidamente ao colapso da colónia, se estas não forem tratada. Os sintomas na colónia podem apresentar-se como um aumento das anomalias na criação, pupas desoperculadas, alvéolos vazios e larvas mortas nos alvéolos. No seu conjunto estes estragos levam a uma diminuição da produtividade das colónias, e nos casos de infecções mais graves à morte da colónia.

1.4 Métodos de diagnóstico

Os métodos de diagnóstico consistem na observação directa, métodos laboratoriais e observação da queda natural dos ácaros. O primeiro método caracteriza-se pela observação directa das abelhas e da criação operculada de obreiras e de zangãos. A observação deve-se focar sobre a criação de zangão, para tal é utilizado uma faca ou um garfo de desopercular, com o qual se abrem os alvéolos com pupas para observar o seu conteúdo. Deve-se observar cerca de 100 alvéolos e contar o número de varroas observadas para se ter uma ideia aproximada do estado da colmeia.

Os métodos laboratoriais consistem na recolha de abelhas adultas ou de cria de abelhas para obter o respectivo nível de infestação de ácaros por extracção laboratorial. No caso das obreiras adultas, recolhe-se entre 50 a 500 obreiras para recipientes que são transportados para o laboratório. No laboratório, depois de mortas as abelhas, adiciona-se água e detergente, ou álcool no recipiente (Francisco, 1990). O recipiente é agitado fortemente durante alguns minutos. Em seguida o conteúdo do recipiente é passado por um crivo de forma a reter as abelhas. No final do processo o número de ácaros que ficaram no recipiente, que recebeu o conteúdo crivado, podem ser logo contados ou o líquido pode ser passado por um pano branco que retêm as varroas tornando-se mais fácil a sua contagem (Mendes, 2004). O cálculo da percentagem de infestação ($I = n^{\circ} \text{ ácaros} / n^{\circ} \text{ abelhas} \times 100$) permite saber o estado da colónia. Se o valor obtido for superior a 5% a colmeia deve ser tratada o mais rápido possível.

Na amostragem das abelhas imaturas, utiliza-se uma faca ou um bisturi para retirar uma determinada área de cria operculada, em geral 1 dm^2 , que é transportada para o laboratório, onde se procede à medição e cálculo da área. Depois é calculado o número

de células nele existente, multiplicando por 2.9 ou 4.2 caso se trate de cria de zangão ou obreira respectivamente. Após esta fase a criação é desoperculada e o seu conteúdo colocado sobre um crivo superior (malha 5mm). Antes deve ser colocado um outro crivo inferior de malha mais fina (0.5mm), o qual pode ser substituído por um pano branco. Após este procedimento, as células com cria são bem lavadas, de forma a retirar todo o seu conteúdo, são deixadas a escorrer e no final as varroas que ficaram no crivo inferior são contadas. O nível de infestação é obtido dividindo o número de ácaros pelo número de células e multiplicando por 100. Para níveis de infestação superiores a 15%, no caso de células de obreiras ou 30% nas células de zangão, deve ser aplicado tratamento contra a varroa (Murilhas & Casaca, 2004). A amostragem da cria permite resultados mais precisos que a amostragem das obreiras adultas.

O método da contagem através de tabuleiros de recolha consiste na contagem da queda natural dos ácaros, recorrendo a uma rede metálica sobre o estrato ou tabuleiros preparados para o efeito ou a estrados modificados dotados de uma gaveta de metal que recebe as varroas que caem. Estas são contadas de forma a estimar a dimensão da população de varroa. A evolução da queda de ácaros ao longo das semanas permite estimar a mortalidade natural da varroa e por estimativa a variação da densidade da sua população (Branco *et al.* 2006).

Cada um dos métodos atrás descritos tem as suas vantagens e desvantagens. Os métodos laboratoriais são muito precisos no entanto, são destrutivos, quer pela morte das abelhas quer pela destruição da cria, pelo que devem ser utilizados com moderação e apenas em algumas colmeias, além disso exigem muito trabalho. A observação directa é um método expedito no entanto, os sintomas das varroas só se fazem sentir quando a população do ácaro já tem uma dimensão considerável e é pouco preciso. O método da contagem dos ácaros por queda natural pode ser influenciável por vários factores, exigindo observações continuadas no tempo, de modo a determinar-se uma linha de tendência. Por outro lado, pode, por vezes, ser difícil a contagem do número de varroas devido à grande quantidade de resíduos. Este método, é, no entanto, o método com melhor aplicação, porque não implica a morte de abelhas nem a destruição de cria, não influencia a dinâmica do ácaro, pode ser utilizado por períodos de tempo consideráveis e tem uma precisão aceitável.

1.5. Controlo da varroose

A varroose não dispensa a aplicação de tratamentos. Em clima temperados as colónias, sem controlo ou com métodos de controlo desadequados, têm graves perdas de produtividade, e acabam por entrar em colapso e morte apenas num ou em poucos anos. No entanto, muitos dos métodos de tratamento utilizados actualmente pelos apicultores, são inadequados para o controlo eficaz da população de ácaros ou não são sustentáveis a longo prazo.

Com vista a tentar ultrapassar o problema da varroa têm sido estudadas e utilizadas uma grande variedade de diferentes substâncias química, técnicas de aplicação e métodos para manter a população do ácaro sobre controlo, envolvendo as áreas da química, biotecnologia e luta biológica.

1.5.1 Compostos de síntese química

Neste grupo encontram-se todos os acaricidas de síntese utilizados para controlar a população de varroa, como seja os organofosforados como cumafos (Perizin®), piretróides como fluvalinato (Apistan®) e flumetrina (Bayvarol®); e amadina amitraz (Apivar®) (Lodesani *et al.* 1995; Milani & vedova, 1996; Milani, 1999; Sammtaro *et al.* 2005; Gregorc & Skerl, 2007). A maioria destes pesticidas actuam por contacto directo e são de fácil aplicação, não requerendo conhecimentos específicos sobre a biologia das abelhas ou dos ácaros (Lodesani, 2004), sendo de uso generalizado.

Um dos inconvenientes destas substâncias é a sua persistência, acumulando-se ao longo de repetidos tratamentos nos produtos apícolas, principalmente na cera (Lodesani *et al.* 2007). Como tal, podem prejudicar as abelhas quando são expostas a concentrações elevadas de vários compostos deste tipo, acumulados na cera (Lodesani, 2004) e podem constituir um problema de saúde pública no consumo dos produtos apícolas. A resistência desenvolvida pelos ácaros a estas substâncias é um outro problema grave resultante do seu uso generalizado (Lodesani *et al.* 1995; Elzen *et al.* 1999; Milani, 1999; Sammtaro *et al.* 2005). Em particular, as repetidas aplicações do mesmo produto (Elzen, 1999) e os tratamentos deixados nas colmeias por tempo excessivo, têm levado a um agravamento dos fenómenos de resistência, dificultando o controlo da varroa nas colónias (Murilhas, 2007).

1.5.2. Compostos químicos naturais

Nesta categoria incluem-se produtos naturais com efeitos acaricidas, como os ácidos orgânicos, ácido oxálico, ácido láctico, ácido fórmico, rotenona, timol e os óleos essenciais (Flores, 1999).

Os óleos essenciais são compostos altamente voláteis, em geral monoterpenos, extraídos de plantas, que lhes confere odores característicos. Um dos problemas dos óleos essenciais é a sua toxicidade para as abelhas, existindo uma pequena diferença entre a dose letal para os ácaros e a dose letal para as abelhas. Em comparação, o fluvalinato é 800-1000 vezes mais tóxico para a varroa do que para as abelhas, enquanto que os melhores óleos essenciais são apenas 2 a 4 vezes mais tóxicos. Os óleos essenciais podem ser absorvidos pela cera mas dissipam-se rapidamente com o tempo (Bogdanov *et al.*, 1998). Podem também criar sabores e odores desagradáveis ao consumidor. Um dos constituintes de óleo essencial mais utilizado é o timol, isolado ou em formulações em que o timol aparece em grande percentagem combinados com outros compostos, em particular ácidos orgânicos como o ácido fórmico (Bogdanov *et al.* 2002; Emsen & Dodologlu, 2009).

Existem no mercado vários produtos em que o acaricida base é uma destas substâncias ou uma mistura delas, e que representam a gama de compostos naturais utilizados no controlo da varroa: Thymovar® (timol), Apiguard® (timol), Apilife VAR® (timol, eucaliptol, mentol e cânfora), Ácido fórmico (solução de ácido fórmico a 65%) e Ácido oxálico (solução de ácido oxálico a 3,5% (Higes *et al.* 1999; Charrière & Imdorf, 2002; Bademacher & Imdorf, 2005; Emsen & Dodologlu, 2009). Este tipo de tratamento tem sido alvo de muitos estudos, incidindo nos detalhes da sua aplicação, concentração, tempo, relação da sua volatilidade com a temperatura e método de aplicação, entre outros.

Alguns destes compostos são eficazes na luta contra a varroa como é o caso do ácido fórmico, capaz de matar a varroa dentro das células seladas. Em geral, estes produtos apresentam baixo risco de contaminação e de acumulação nos produtos apícolas, pois a maior parte destas substâncias são solúveis em água e/ou voláteis e são ingredientes naturais do mel (Murilhas & Casaca, 2010). Assim, diminui o seu risco de contaminação do mel e da cera de abelha. Têm ainda uma reduzida probabilidade de provocar resistências (Felipe & Vandame, 1999).

No entanto, a aplicação e a eficácia de alguns destes produtos apresentam desvantagens. Por exemplo, o ácido oxálico e o ácido láctico têm de ser aplicados em períodos em que não exista cria na colmeia. No caso de Portugal isto torna muito difícil a sua utilização, pois nas nossas condições as colónias apresentam criação durante quase todo o ano com raras excepções. A eficácia de algumas destas substâncias está dependente, da temperatura e das taxas de volatilização dentro da colmeia. Por outro lado, o intervalo entre a sua eficácia sobre o parasita e a sua toxicidade sobre a abelha não é muito grande. Um dos grandes entraves à utilização destas substâncias é o facto destas formas de luta terem resultados muito mais incertos do que os meios de luta com químicos de síntese.

Estudos feitos com a tintura de própolis, um outro produto natural retirado das próprias colónias, revelam que este produto tem também algum potencial na diminuição da taxa de progressão da população de varroa. Mas tal como outros compostos orgânicos tem o problema de não ser completamente eficiente, exigir muita mão-de-obra e ter elevada variabilidade da sua composição química (Mendes, 2004)

1.5.3 Métodos biotecnológicos, genéticos e biológicos

Neste tipo de luta encontra-se, entre outros métodos, a colocação de quadros (armadilha) com alvéolos de zângão. Estes quadros recebem a criação de zângão, que por sua vez atraem varroas, que depois são retirados da colmeia antes da criação nascer, removendo-se assim, um número significativo de ácaros (Llorente *et al.* 1994; Calderone, 2005). Uma outra técnica consiste em retirar a rainha, ou prendê-la numa determinada área, de forma a diminuir a área de postura, por um determinado período, interferindo-se, deste modo, no ciclo de vida do ácaro por interrupção da sua fase reprodutiva. A utilização de placas de cera moldada com células de dimensão mais pequena, pode também levar a uma diminuição das taxas de infestação. Alguns métodos biotecnológicos podem ser eficazes, atrasando consideravelmente o crescimento da população de varroas, e reduzindo significativamente a utilização de químicos por parte dos apicultores (Llorente *et al.* 1994). No entanto, todos os métodos deste tipo exigem muita disponibilidade da parte do apicultor, experiência e técnicas de manejo correctas. Por outro lado, se as colónias se encontram num estado muito avançado da infestação estes métodos não são suficientes para o controlo da população de ácaros, só sendo eficazes a densidades baixas das populações (Llorente *et al.* 1994).

Nos métodos genéticos estuda-se a possibilidade de melhoramento de colónias de abelhas optimizando o seu comportamento higiénico. Este comportamento potencia a libertação do ácaro pelas abelhas parasitadas e a sua expulsão das colónias, estando por isso associado a uma maior capacidade da colónia em resistir ao aumento da população de ácaros. Ou seja, trata-se de seleccionar abelhas tolerantes ao parasita, entende-se por tolerante a capacidade das abelhas conviverem com o parasita sem que se dê o colapso das colónias, tal como acontece com o hospedeiro natural deste parasita, *Apis cerana* (Serrano *et al.* 2001).

Entre os métodos de luta biológica que têm sido testados contra a varroa com algum sucesso regista-se a utilização de alguns fungos que atacam naturalmente a varroa, tal como *Hirsutella thompsonii* Fisher e *Metarhizium anisopliae* Metsch. Estes fungos são promissores no controlo da varroa, porque infectam directamente o ácaro, por outro lado são baratos de produzir, germinam sobre o hospedeiro a uma temperatura entre os 25-32°C, sendo pouco patogénicos para as abelhas. Estes fungos foram testados em colónias de *Apis mellifera* com sucesso dando-se uma redução significativa de ácaros por abelha ao fim de 21 a 42 dias após o tratamento. Como os outros métodos acima descritos, estes agentes de luta biológica também apresenta desvantagens, a saber i) não têm grande efeito sobre a população de ácaros que se encontra nas células operculadas; ii) o tempo de aplicação é crítico para um bom controlo da população do ácaro sendo a temperatura um dos factores determinantes; iii) só começam a fazer efeito passado algum tempo após a sua aplicação, iv) alguns fungos podem causar a morte das abelhas (Kanga *et al.* 2002; Shaw *et al.* 2002).

Como tal são necessários mais estudos para desenvolverem aplicações tecnológicas mais eficientes, reduzir o tempo requerido por aplicação e desenvolver tratamentos mais económicos para os apicultores.

Uma parte deste trabalho teve como objectivo, avaliar a evolução da população de ácaros, quando a rainha é retirada da colmeia e em seguida é-lhe aplicado um tratamento químico contra a varroa, e perceber se esta forma de luta biotécnica integrada com luta química poderá ser utilizada pelos apicultores, pelo que no capítulo 2 se apresenta um aprofundamento deste tema.

2. Parte I: Exclusão da rainha como estratégia biotécnica

2.1 Fundamento biológico

O sucesso reprodutivo da varroa na *Apis mellifera* está positivamente correlacionado com a duração da fase operculada do hospedeiro, nesta espécie de abelhas a reprodução do ácaro dá-se na criação de zangão e na criação de obreira (Calderone *et al.* 2005). As varroas não sobrevivem mais do que alguns dias sem acesso à criação das abelhas. Assim sendo a rainha desempenha um papel fundamental no controlo e gestão da população de varroa. Um estudo realizado por (Akyol *et al.* 2007), mostram que a utilização de rainhas novas, com 0 e 1 ano, tem influência nos níveis de infestação de varroa e nos danos causados pela varroa, sendo que a infestação da colónia pode ser diminuída utilizando rainhas novas. No entanto a ausência de criação devido à suspensão da postura por parte da rainha, influencia altamente a taxa de mortalidade do ácaro levando a um aumento considerável da mortalidade natural do ácaro no período em que não existe criação, principalmente nas primeiras semanas em que a colónia fica sem cria. Em contraste, quando a criação de larvas de abelhas é reiniciada, a quantidade de ácaros mortos diminui consideravelmente, devido à invasão da criação de abelha por parte dos ácaros foréticos onde ficam protegidos durante cerca de 2 semanas (Branco *et al.* 2006).

A taxa de mortalidade do ácaro está ainda dependente da sua densidade, quando as infestações são muito elevadas, isto é, com uma proporção de ácaro por abelha superior a 1. Para taxas de infestação mais baixas a mortalidade é independente da densidade, com uma taxa de queda média diária do ácaro constante de aproximadamente $0,011\text{dia}^{-1}$ (Branco *et al.* 2006).

Um aspecto muito importante no ciclo de vida da varroa é o tempo que decorre desde a operculação dos alvéolos de criação de abelha, pouco antes da fase de pupa até ao momento da emergência da nova abelha, quanto maior for este período maior será o número de varroas fêmeas que chegam à maturidade (Wilkinson & Smith, 2002). O modelo desenvolvido por estes autores indica que uma redução do tempo em que a cria está operculada em cerca de 10% reduziria o crescimento da população de ácaros em 30% na cria de zangãos e 60% na cria de abelhas.

Por outro lado, a taxa de mortalidade natural dos ácaros é diferente no verão e no Inverno. À medida que as varroas vão emergindo das células de criação estão sujeitas a uma mortalidade pós-emergência. Os ácaros que se encontram sobre obreiras que morrem fora das colmeias morrem com estas, o que determina uma taxa de mortalidade superior no verão quando a criação está presente (0,006). A taxa de mortalidade natural estimada no Inverno é de 0,002, com a criação ausente (Martin, 1998). Estudos demonstram que o número de ácaros (fêmeas), que caem durante a emergência da cria de abelha aumenta por um factor de 6 (Lobb & Martin, 1997) em relação aos períodos em que não há cria. Cerca de 50% desses ácaros que caem 24h após a sua emergência ainda estão vivos e representam 15-19% da população total de ácaros que surgiram a partir das células de obreiras. A proporção total da população de ácaros emergentes a cair diariamente, durante a emergência da cria é cerca de 30% (Martin & Kemp, 1997 citado em Martin, 1998). O facto de existir criação ou não existir criação na colmeia vai determinar diferentes taxas de quedas diárias natural do ácaro, independentemente do tamanho da população, o que por sua vez também influencia o tamanho da população do ácaro.

Na aplicação de um acaricida de contacto, com uma eficácia diária de 50 a 100%, a queda da varroa reflecte a distribuição de ácaros no interior da colónia pelo facto de que apenas os ácaros foréticos são mortos, e cerca de 65% da população de ácaros está na cria operculada (55% na criação de obreiras e 10% nos zângãos) (Martin, 1998). Se não existir cria a eficácia aumenta, o que justifica a combinação dos métodos biotécnicos com o controlo químico.

Após uma longa pesquisa em bases de dados electrónicas como o Science direct, Google académico e ISI Web of knowledge, e da revista Apidologie, com as palavras-chave: bloodless, brood interruption, queen exclusion e remove the queen, concluímos que não existem muitos trabalhos científicos sobre a luta biotécnica por exclusão da rainha como forma complementar de controlar a população de ácaros de varroas. Dos poucos trabalhos que faziam alguma referência a esta técnica, referia-se que, a ausência na colmeia de cria de obreira durante 24 dias permitiu que o timol removesse 90% da população de ácaros da colónia (Goodwin & Eatton, 1999), e um outro em que apresentavam as seguintes vantagens e desvantagens (Imdorf *et al.* 2003):

Vantagens

- Permite diminuir a quantidade de tratamento contra a varroa.
- Diminui a população de varroas e os efeitos negativos desta e assim permite atrasar o tratamento contra a varroa no tempo.
- Permite aumentar o número de colónias quando a rainha é retirada para um núcleo, ou substituir colónias que entretanto morreram.
- Os procedimentos biotecnológicos vêm apresentar uma medida de segurança adicional.
- Medida fácil de implementar pelos apicultores com poucas colmeias.
- Uma forma de renovar as rainhas.

Desvantagens

- Difícil de implementar pelos apicultores profissionais.
- Exige muito trabalho e muito tempo.
- As medidas biotécnicas por si só não são suficientes para o controlo da varroa.
- Afecta a produtividade da colmeia e a dimensão da população podendo a colmeia ficar zanganeira caso a rainha esteja ausente por um longo período de tempo.

2.2 Material e Métodos

A componente prática do ensaio sobre a influência da exclusão da rainha quando conjugada com tratamentos químicos contra a varroa, decorreu no Posto Apícola, situado na Tapada da Ajuda, pertencente ao INRB (Instituto Nacional de Recursos Biológicos), Unidade de Investigação de Silvicultura e Produtos Florestais, em colmeias povoadas do tipo Lusitana.

Foi estabelecido a utilização de uma amostra de 16 colmeias, que foram seleccionadas de acordo com os seguintes critérios: não apresentar sintomas de outras patologias a não ser varroose, ter uma boa população de abelhas e ainda não ter sido tratada contra a varroa recentemente.

Este trabalho surgiu do seguimento de observações anteriores, em que tratamentos aplicados em colónias que não apresentavam postura, durante alguns períodos por razões diversas, pareciam ter resultados mais rápidos quando comparados com

tratamentos efectuados em colónias que tinham a rainha e não apresentavam interrupção no período de criação. Verificando-se esta hipótese, o método poderia ser utilizado pelos apicultores para melhorar os resultados e reduzir o tempo dos tratamentos.

2.2.1. Delineamento experimental e método de amostragem

As colónias seleccionadas foram divididas aleatoriamente em dois grupos de oito, em que num dos grupos as colónias foram orfanizadas e no outro não (Anexo 1.2). As rainhas das colónias orfanizadas eram retiradas para núcleos, previamente povoados com abelhas e dois a três quadros de cria e reservas, um quadro com reservas e os restantes de cria quase a nascer. Estes quadros foram retirados de colónias que não faziam parte do ensaio. Todas as colónias do ensaio receberam o mesmo tipo de tratamento químico, Bayvarol® da Bayer®. O tratamento esteve nas colmeias durante 6 semanas conforme as indicações de utilização do produto.



Figura 6: Tabuleiros utilizados na recolha da varroa durante o ensaio; Fonte: autor

A queda de varroa foi monitorizada num período de 75 dias, de 30 de Setembro de 2009 a 14 de Dezembro de 2009, recorrendo-se a estrados modificados, com rede de 3mm de malha, e gaveta inferior com tabuleiros amovíveis revestidos com uma folha de papel branco (Figura 6 e 7). Os tabuleiros foram inspeccionados 1 a 3 vezes por semana. Em cada observação contabilizou-se o número de varroas que caíram nesse período. A monitorização da queda de varroa começou duas semanas antes do tratamento e no final prolongou-se cerca de duas semanas após ter sido retirado o tratamento.



Figura 7: Tabuleiro utilizado na recolha dos ácaros de varroa; Fonte: autor

2.2.2. Estimativa da área de postura



Figura 8: Suporte utilizado para tirar as fotos aos quadros;
Fonte: autor

Para o ensaio foram calculadas as áreas de posturas, isto é toda a área de cria existente em cada colónia, duas vezes, a primeira antes do tratamento e da orfanização das colónias que ficaram sem rainha (12/10/2009) e a segunda logo após o tratamento das colónias com o químico, ou seja, no final do tratamento a (7/12/2009). A estimativa das áreas foi feita a partir de imagem fotográfica. As fotos foram tiradas todas à mesma distância com o mesmo ângulo de inclinação, com o auxílio de um suporte, onde era colocado o quadro (Figura 8).

No mesmo suporte estava a máquina fotografia a uma distância fixa. A estimativa das áreas de postura foram obtidas, a partir das fotos, com o programa WinSeeDLE Pró V2008a, a soma das áreas individuais dos quadros de cada

colónia, permitiu obter a área total de cria por colónia.

2.2.3. Dados meteorológicos

No período em que decorreu o ensaio, foram recolhidos dados meteorológicos na estação meteorológica da Tapada da Ajuda, pertencente ao Instituto Superior de Agronomia, correspondentes aos meses de Setembro, Outubro, Novembro e Dezembro (Figuras 9 e 10, Anexo 1.5).

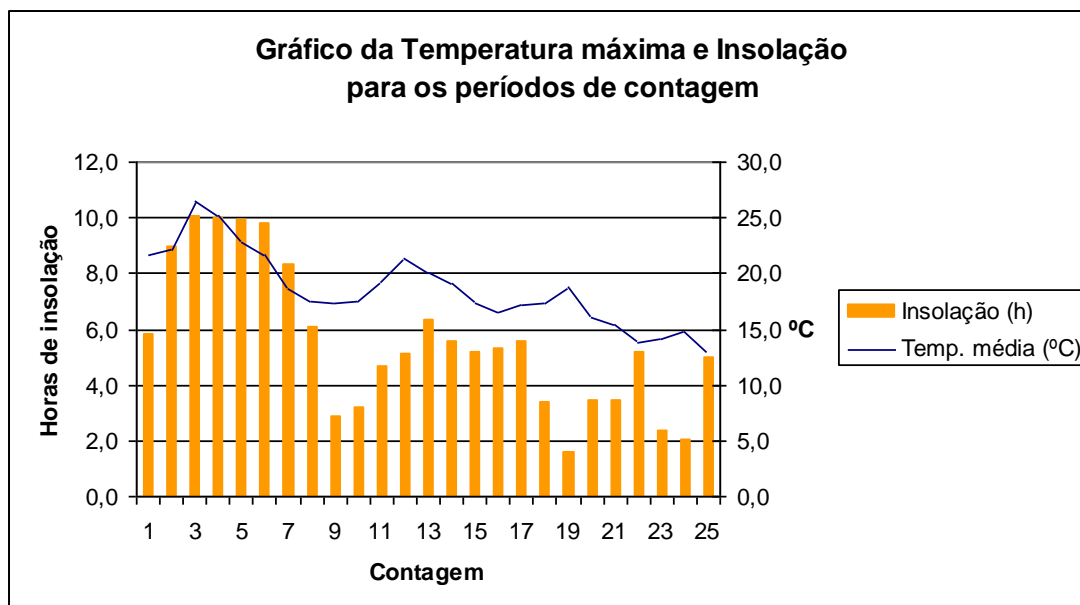


Figura 9: Temperaturas médias e a insolação média para cada período de contagem, durante o ensaio.

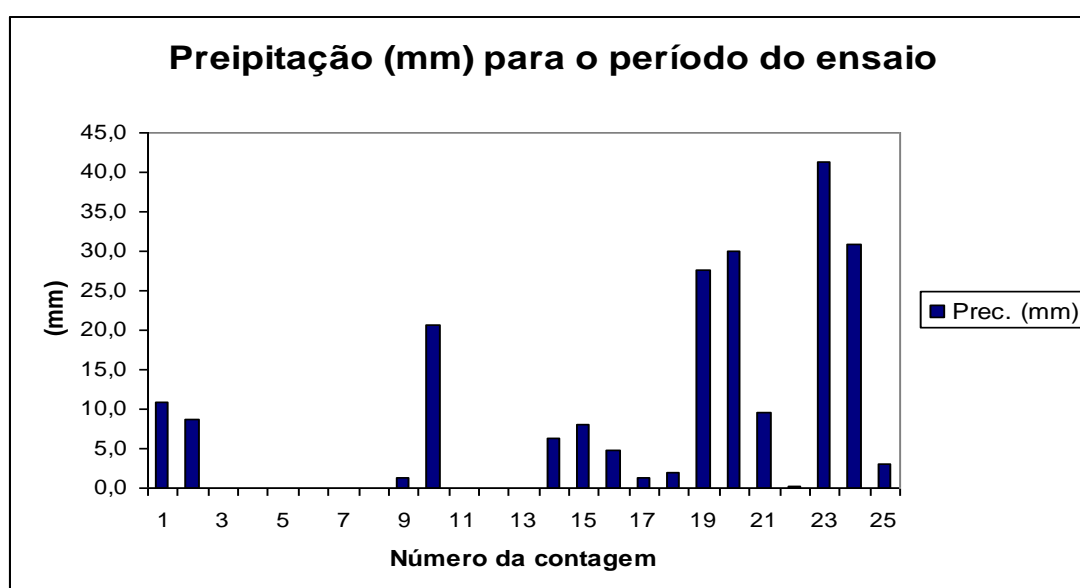


Figura 10: Precipitação acumulada (mm) entre cada contagem, para o ensaio,

2.2.4 Dificuldades verificadas

No decorrer do trabalho, surgiram alguns problemas que impediram o desenvolvimento do trabalho como inicialmente programado. Entre elas encontram-se as limitações de material, de tempo disponível para a realização de mais repetições e a realização de uma outra modalidade com outro tipo de tratamento. Inicialmente, estava previsto serem feitas contagens diárias das varroas que não foram possíveis pelas limitações ao nível do tempo. A meteorologia também não ajudou, em algumas das colónias orfanizadas, as rainhas virgens não conseguiram completar com sucesso todo o processo sexual, pelo que no final do ensaio existiam colónias ainda órfãs, uma delas já zanganeira (colmeia 14). Outro aspecto importante, foi o facto das colónias apresentarem uma grande variação quanto à dimensão inicial da população de varroa, em alguns casos com níveis críticos de infecção o que veio dificultar o processo de selecção das colónias e o tratamento dos dados.

2.2.5 Análise de dados

Para se poder fazer uma comparação entre colónias tratadas e não tratadas, tivemos de recorrer aos seguintes pressupostos: i) as populações de ácaros iniciais em cada um dos grupos de colónias tinham dimensões iguais, ii) o efeito do tratamento não dependeu de outros factores além dos tratamentos delineados, e que não foram controlados, como por exemplo a quantidade de postura e a dimensão inicial da população da colónia; iii) não sendo possível controlar as migrações, isto é a entrada e saída de ácaros nas colónias, pressupõe-se que não houve migrações significativas no período ou se as houve os fluxos migratórios (emigração-imigração) foram idênticos para todas as colónias; iv) não sendo possível controlar a dinâmica reprodutiva do ácaro, admitimos por hipótese, que as taxas reprodutivas foram semelhantes para todas as colónias.

Para verificar alguns dos pressupostos acima mencionados efectuaram-se testes preliminares, em particular para testar 1): igualdade da população da varroa nos dois grupos de colónias; 2) igualdade da área de cria nos dois grupos de cria. Para estes testes usou-se a estatística t de Student, para comparação de médias. Para testar a hipótese 1, assumiu-se que a população total de varroa no início do ensaio, em cada colmeia, era proporcional ao total de varroas caídas no tabuleiro antes da aplicação do

tratamento, comparando-se estes valores médios. Um aspecto importante na área de cria, hipótese 2, que interfere nos resultados, resulta do facto das varroas necessitarem da criação para completarem o seu ciclo de vida. Por outro lado, a varroa dentro das células de cria operculada encontra-se protegida da acção dos acaricidas.

As contagens das varroas não foram realizadas em intervalos de tempo iguais, pelo que se dividiu a queda de varroas pelo número de dias, estimando-se a queda diária de varroas. Para expressar os dados em percentagem de ácaros mortos por período assumiu-se que os dados das contagens são cumulativos, isto é, os indivíduos da população de varroa que morrem e caem para o tabuleiro podem ser somados como indivíduos mortos, dividindo-se o número de indivíduos mortos em cada período pelo total da população de varroa.

Numa análise preliminar os dados foram tratados em Excel. Após esta primeira fase de transformação dos dados, em que os dados da queda foram somados de forma a obter a população total de varroa que caiu, em seguida o valor acumulado da varroa caída era dividido pelo valor total de queda e multiplicado por cem por cento de forma a obter a percentagem de queda de varroa acumulada ao longo do tempo tornando possível a comparação entre colónias, estes foram tratados no programa estatístico R.

Foi utilizada a estatística t para testar se a área de postura final e inicial era igual entre grupos, assim como a queda inicial de varroas. Os dados são expressos em média (\pm erro padrão).

O principal objectivo deste ensaio era testar a influência da rainha no efeito do tratamento contra a varroa. Para testar diferenças na queda final de varroa, variável dependente, contornando a influência das diferenças iniciais entre colónias realizou-se uma ANCOVA, sendo a covariável a queda inicial de varroas, considerando a Rainha como factor. Para a queda percentual de varroas ao longo do tempo os dados foram tratados com uma ANOVA – hierarquizada, tendo como factores a rainha, com dois níveis, com ou sem, o tempo decorrido desde o início do tratamento, e a colónia hierarquizada dentro do primeiro factor. Para confirmar os pressupostos das ANOVAs procedeu-se ao teste da homogeneidade de variâncias com o teste de Bartlett.

Após esta fase desenvolveu-se um modelo de regressão linear múltipla, que tinha como objectivo testar quais as variáveis que mais influenciaram, a percentagem acumulada de ácaros caídos em relação ao total da população de ácaros. As variáveis explicativas iniciais incluíam os parâmetros: colónia; rainha (com ou sem), temperatura média em °C (tempmedia), temperatura máxima em °C (tempmax), insolação em horas (insolacao),

precipitação em mm (precipitacao), área de postura inicial (areaposturainicio), área de postura final (areaposturafinal), um valor da população de varroas estimado a partir do valor médio diário de queda de varroas antes do ensaio (estimativapop) e por fim o número referente à contagem que deu origem à percentagem acumulada de ácaros mortos (numerocontagem) (Anexo 1.6).

Todas as análises estatísticas foram feitas recorrendo ao programa R – R version 2.7.2 (2008-08-25) Copyright (C) 2008 The R Foundation for Statistical Computing ISBN 3-900051-07-0.

2.3. Resultados

2.3.1 Verificação de alguns pressupostos iniciais

Um dos pressupostos iniciais a ser validado de forma a consolidar os resultados e conclusões do trabalho é de que as populações iniciais de varroa eram semelhantes nos dois grupos de colónias (com e sem rainhas). O resultado do teste à variável indicou não existirem diferenças significativas na queda média diária de varroas observada antes do tratamento nos dois grupos de colónias, sem e com rainha ($t = 0.677$, $p = 0.510$). Considera-se assim que os dois grupos de colónias apresentavam uma população média de varroa inicial semelhante. A média da queda diária de varroa em cada um dos grupos foi de $40 (\pm 22.14)$ varroas por dia no grupo sem rainha e de $33 (\pm 15.48)$ varroas por dia no grupo com rainha.



Figura 11: Foto com a área de cria;
Fonte: autor

Outro pressuposto utilizado foi o de que a área de cria (Figura 11) inicial não diferia significativamente entre grupos. A heterogeneidade existente na área de cria entre as várias colónias, quer no início do ensaio quer no final, era elevada (Figura 12). No entanto, quando é feita a média das áreas de postura, para os dois momentos do ensaio, a diferença entre grupos é reduzida (Figura 13). O resultado do teste t , $t = 0.544$, $p =$

0.595 , permite-nos concluir que os valores médios de área de cria inicial eram idênticos nos dois grupos. A média da área de cria inicial, em cm^2 , nas colónias do grupo sem rainha era de $1642.3 (\pm 677.19)$ e com rainha de $1751.429 (\pm 702.89)$. Verificados estes

dois pressupostos, as conclusões sobre os resultados oferecem uma maior confiança. No final, a área de cria foi também idêntica nos dois grupos, $t = 0.584$, $p = 0.5681$ (Figura 13).

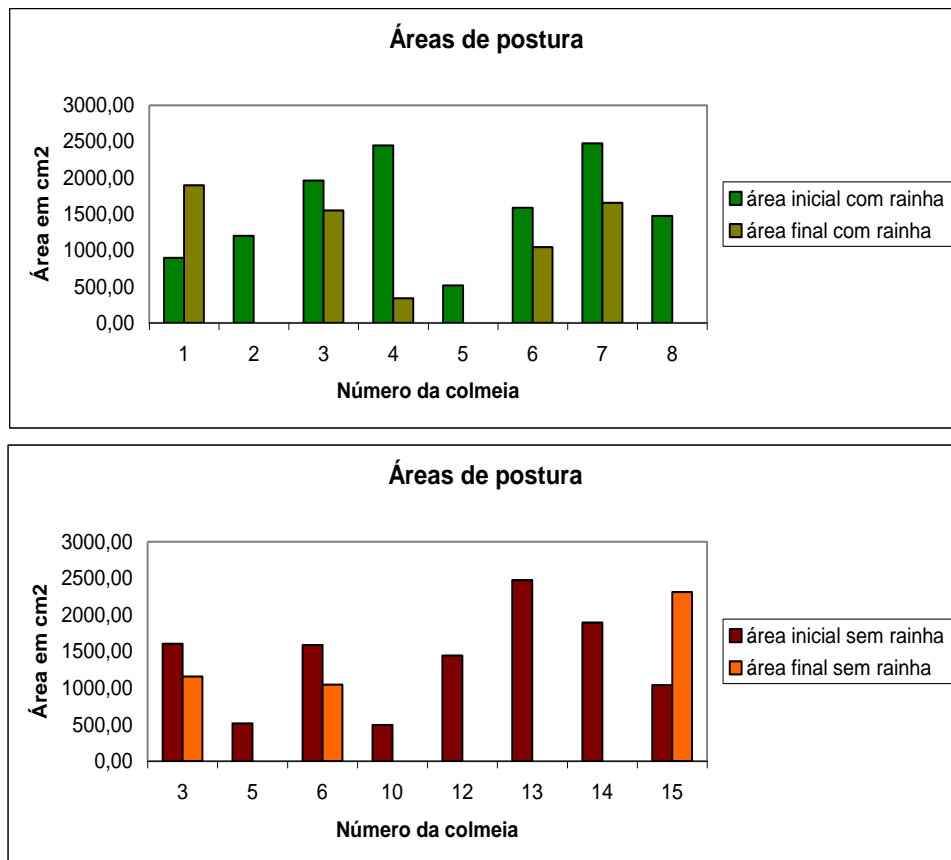


Figura 12: Área de postura no início do ensaio e no final para todas as colónias.

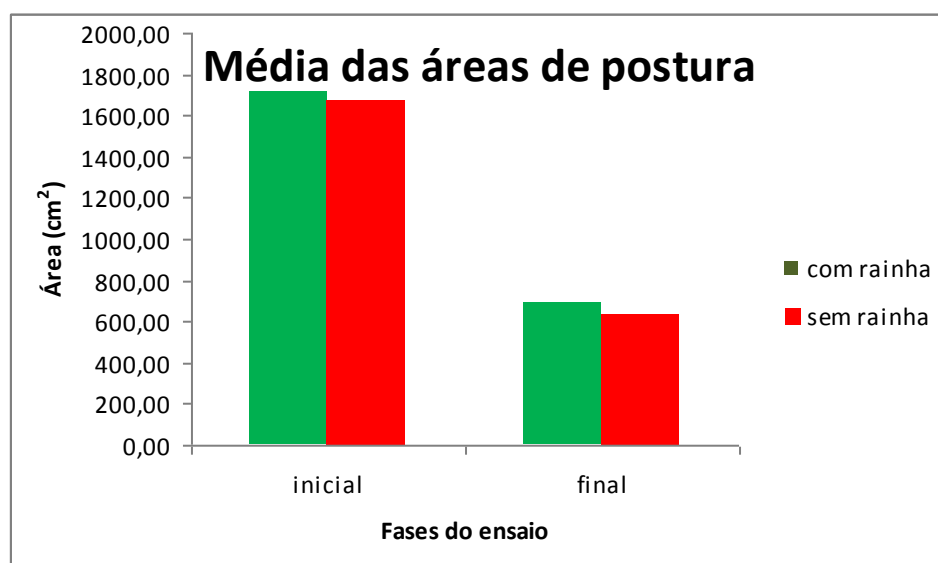


Figura 13: Média das áreas de postura para os dois grupos de colónias nas duas fases do ensaio.

2.3.2. Evolução da população de *Varroa destructor*

Os dados das contagens da queda de varroa são apresentados no Anexo 1.1. Após a transformação aos dados da queda natural da varroa em percentagem acumulada do total, foi possível observar diferentes padrões nas colónias com e sem rainha (Figuras 14 e 15).

O ensaio começou dia 30 de Setembro de 2009 e terminou dia 14 de Dezembro de 2009, o que corresponde a um intervalo de 75 dias. O tratamento químico foi aplicado nas colónias dia 13 de Outubro, correspondendo ao dia 14 do ensaio, quando começa a fase exponencial nas curvas médias de percentagens acumuladas.

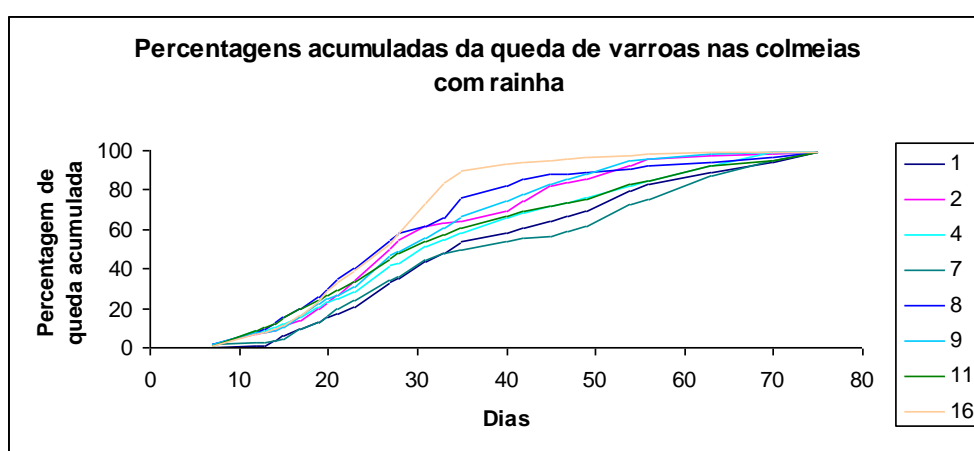


Figura 14: Percentagens acumulada de ácaros mortos nas colónias com rainha, ao longo do ensaio. O tratamento químico teve início no dia 14.

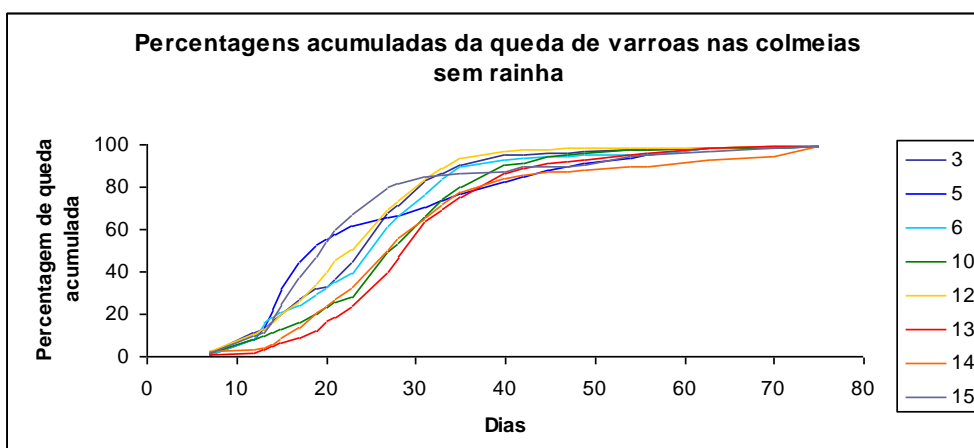


Figura 15: Percentagens acumulada de ácaros mortos nas colónias sem rainha, ao longo do ensaio. O tratamento químico teve início no dia 14.

Na comparação dos dois gráficos é visível que nas colónias sem rainha, a percentagem de queda aproxima-se muito mais rapidamente da assíntota dos 100% do que no caso

das colónias com rainha. Havendo um período de rápido crescimento nas curvas das quedas das varroas nas colónias sem rainha, entre o dia 15 e o dia 35, após o início do tratamento, a partir deste ponto começam a estabilizar e a tender para a assíntota. Nas colónias que ficaram com rainha, este padrão só se verifica na colónia nº 16. No grupo de curvas de colónias com rainha, o período de maior crescimento das curvas dá-se mais tarde e é menos nítido que no grupo que ficou sem rainha. Revelando que a morte das varroas acontece mais tarde e em percentagens menores em relação ao grupo que ficou sem rainha. A colónia 16 que apresenta um padrão muito semelhante às colónias sem rainha, perdeu a rainha na parte inicial do ensaio, por isso esta colónia será excluída em situações que este facto possa influenciar os resultados. O mesmo acontecerá também com a colónia 14, que ficou zanganeira, após algum tempo sem rainha, levando a um aumento da queda de varroa na parte final do ensaio.

Na Figura 16 é visível um aumento rápido da mortalidade das varroas nos dois grupos, numa fase inicial do ensaio. Numa segunda fase, acima dos 50% de mortalidade começa a ser visível um aumento mais rápido na taxa de varroas mortas no grupo sem rainha em relação ao grupo que ficou com rainha, chegando a existir uma diferença de cerca de 20% na taxa de queda acumulada, por volta do dia 30, cerca de 15 dias após ter sido aplicado o tratamento. A taxa da modalidade com rainha situa-se nos 60% de queda em relação à população total e no caso da modalidade sem rainha esta percentagem situa-se nos 80%. Por outro lado, a variabilidade da percentagem de queda de varroa em cada um dos grupos não é semelhante, no grupo sem rainha verifica-se uma maior variabilidade entre colónias numa fase mais inicial do ensaio, enquanto que no outro grupo com rainha esta variabilidade acontece numa fase mais avançada do ensaio (Figuras 14, 15 e 16).

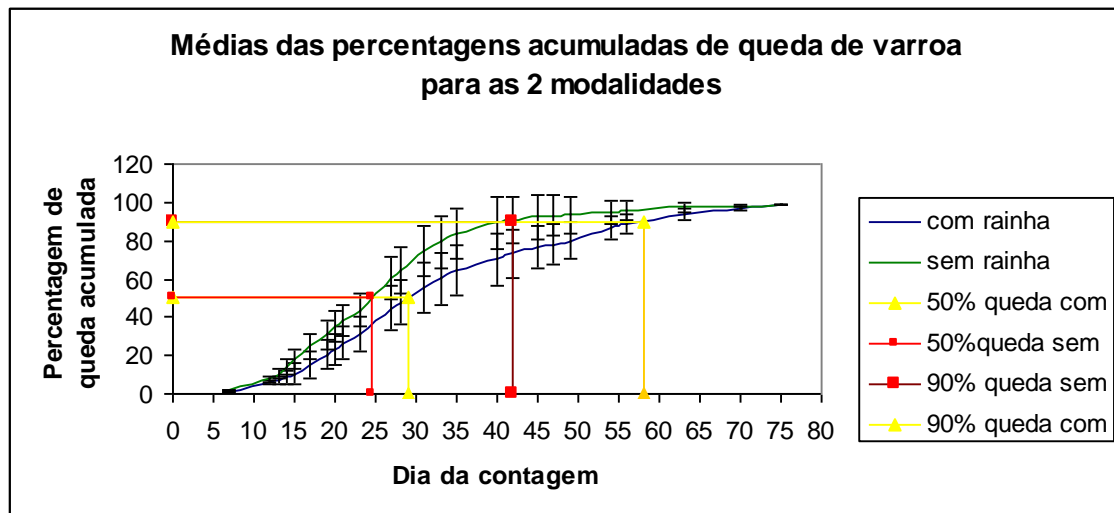


Figura 16: Médias (\pm ep) das percentagens acumuladas de morte das varroas para as duas modalidades, com e sem rainha.

O factor rainha foi significativo na queda percentual de varroa, expressa em percentagem por período, considerando-se o factor rainha e o factor tempo ($F=12.783$; g.l.=1; 346, $p < 0.001$). Portanto, houve diferenças significativas nos padrões de mortalidade das varroas ao longo do tempo entre os dois níveis de tratamento efectuados às colónias. Pelo contrário ao nível da colónia, hierarquizado dentro de cada grupo, não se verificam diferenças significativas nos padrões de mortalidade das varroas ao longo do tempo ($F=0.293$; g.l.= 2; 346, $p = 0.746$). O teste de Bartlett's confirma o pressuposto da homogeneidade de variâncias ($K\text{-squared} = 0.8734$, $p = 0.350$).

2.3.3 Modelo de regressão múltipla

Foi construído um modelo de regressão múltipla para determinar que parâmetros mais influenciam o valor de ácaros mortos ao longo do ensaio, variável y. O modelo é significativo $F = 619.3$; gl= 9; 390; $p < 0.001$, com uma percentagem de variabilidade explicada pelo modelo de $R^2=0.93$.

No entanto, algumas das variáveis consideradas no modelo eram pouco significativas, o que determinou a sua exclusão. Foi excluída a variável temperatura máxima (tempmax), dando origem a um modelo mais simples em que todas as variáveis são significativas. Os resultados obtidos não diferem muito do modelo anterior ($R^2 = 0.93$ $F= 698,2$; gl=8; 391; $p < 0.001$), pelo princípio da parcimónia optamos por este modelo.

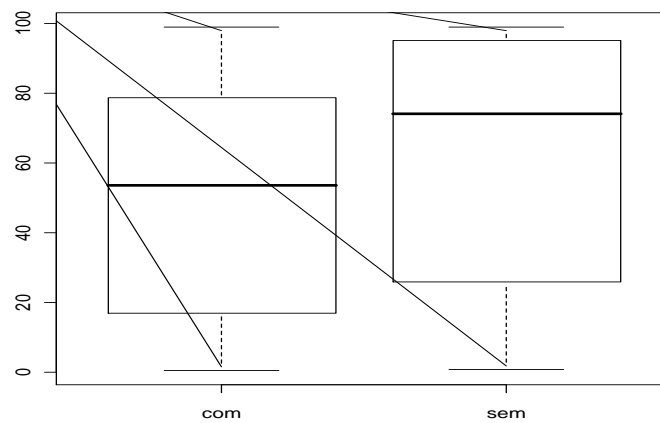


Figura 17: Box-plot dos valores de queda de varroa estimados pelo modelo em função da variável rainha.

Verifica-se ainda que as variáveis, temperatura máxima e insolação são as duas variáveis ambientais mais importantes no modelo (Fig. 18 e 19).

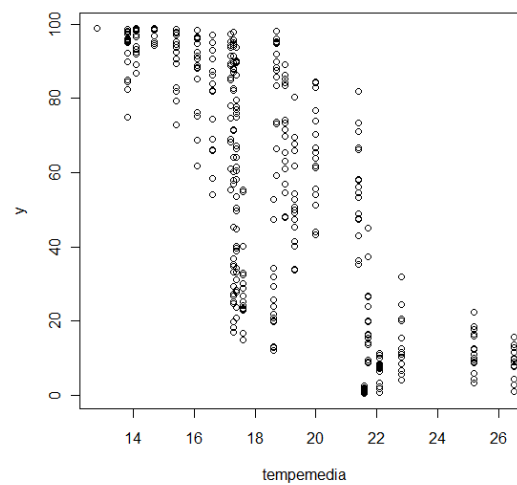


Figura 18: Relação entre a queda percentual de varroa (y) e a temperatura média.

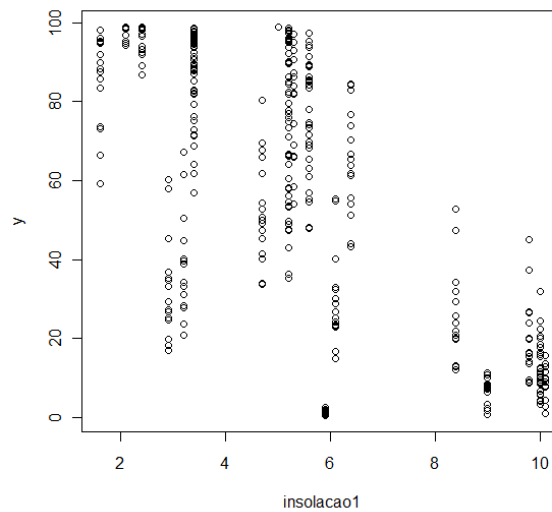


Figura 19: Relação entre a queda percentual de varroa (y) e a insolacao1.

2.3.4 População final da Varroa e área de cria

Na análise da queda final de varroa, duas colónias foram excluídas, a 14 por ter ficado zanganeira, o que influencia os resultados finais, e a 16 porque perdeu a rainha pouco tempo após ter começado o ensaio (sendo esta colmeia do grupo com rainha).

O grupo que ficou sem rainha apresentou uma média de queda diária de varroa pós-tratamento de $3 (\pm 2.95)$, valor significativamente inferior ao outro grupo com rainha, com $26 (\pm 19.44)$, $t = -3.5419$, $df = 6.259$, $p = 0.011$. O resultado da ANCOVA para confirmar se a rainha tinha ou não influência na diminuição da população de ácaros, foi também significativo ($R^2=0,60$; $F=8,106$; g.l. 2 e 11 e $p=0,006$), sendo o factor rainha significativo, $p= 0,017$. O factor rainha desempenhou um papel diferenciador nos resultados entre os dois grupos de colmeias em que as colónias tratadas sem rainha apresentam no final um menor número de varroas.

2.4. Discussão

Tal como observado por outros autores (Goodwin & Eatton, 1999; Imdorf *et al.* 2003), verificou-se neste trabalho, apesar da pequena amostragem e das dificuldades logísticas, uma diminuição significativa na população de varroa nas colónias tratadas e sem rainha, relativamente ao grupo das colónias tratadas e com rainha.

No entanto, a eficácia global do tratamento, em qualquer dos grupos não foi totalmente satisfatória, dado que após o tratamento a queda natural das varroas continuou a ser em média de 3 e 26, respectivamente nas colónias sem e com rainha. Alguns aspectos anómalos poderão, ter influenciado os resultados obtidos, tais como, o facto de o tratamento químico não ter tido a eficácia esperada, possivelmente devido a algum tipo de resistência desenvolvido pelas varroas. Outro aspecto que terá influenciado os dados foi o facto do ensaio ter começado um pouco atrasado no tempo, em que algumas das colónias já apresentavam populações de varroas muito grandes, apesar de apresentarem uma boa densidade populacional de abelhas. O tratamento decorreu durante o Outono, altura em que ocorreu um decréscimo da temperatura média, uma diminuição das horas de sol e alguma precipitação, factores estes que têm influência na actividade das abelhas e na fecundação das rainhas virgens atrasando e dificultando os trabalhos por falta de condições apropriadas. Daí que no final do ensaio ainda existissem algumas colónias sem criação e sem postura.

Noutros trabalhos verificou-se que a taxa de mortalidade da varroa é maior no Verão com cria, do que no Inverno sem cria, 0,006 e 0,002 respectivamente, isto para, longos períodos sem criação de abelha em locais onde existe suspensão natural da postura por parte da rainha (Lobb & Martin, 1997). A taxa de mortalidade aumenta no Verão, na altura em que há cria na colmeia porque há reprodução da varroa na cria operculada e quando se dá a emergência das células as varroas estão sujeitas a mortalidade pós-emergência. Outro facto que faz aumentar a taxa de mortalidade do ácaro é uma maior actividade por parte das abelhas, o que leva à morte de algumas abelhas fora da colmeia nas actividades de campo e a respectivas varroas que estão sobre estas (Martin, 1998). No nosso estudo verificou-se que as variáveis temperatura média e insolação tinham influência na queda natural da varroa, o que vem demonstrar a influência da actividade das abelhas na morte das varroas também durante os tratamentos químicos. No nosso estudo observou-se uma redução da queda natural da varroa nas colónias com a

temperatura e insolação, significando, talvez que um maior número de varroas veio a morrer no campo, na sua fase forética sobre as abelhas de campo.

Para Portugal, foi observado no trabalho feito por Branco *et al.* 2006, que a suspensão da postura por curtos períodos de tempo leva a um aumento da taxa de mortalidade natural do ácaro no período em que não há criação, principalmente nas primeiras semanas em que as colónias ficam sem cria. Quando volta a haver cria esta taxa volta a diminuir consideravelmente, porque passam a ter onde se refugiar e se reproduzir. Este facto leva-nos a considerar que a área de cria pode ser um factor importante. No nosso estudo, os dois grupos de colónias estavam em condições de igualdade antes do tratamento quer quanto à área média de criação, quer quanto à taxa média diária de queda de varroa, extrapolando-se daqui que a dimensão média da população inicial de varroas também estavam em condições semelhantes, se for tido em conta que a taxa média diária de ácaros é constante para os dois grupos e representa 0,11% da população total existente na colmeia (Branco *et al.* 2006). Confirmou-se assim dois dos principais pressupostos iniciais o que nos dá alguma confiança nos resultados obtidos.

No acompanhamento da evolução das curvas de percentagem acumulada de queda da população de varroas, os dois grupos tiveram comportamento distinto. No grupo de colónias que ficou com a rainha, é visível que as curvas de percentagens acumulada de queda de varroa em relação ao total de varroa caída, não tiveram diferentes fases bem marcadas, pelo contrário no grupo de colónias que ficou sem rainha observa-se um período de crescimento exponencial, em que a quantidade de ácaros mortos aumenta muito em relação ao total, seguida de uma fase de desaceleração desse movimento e a curva da percentagens acumuladas tende para uma assíntota, estando de acordo com a teoria que há um aumento na taxa de mortalidade dos ácaros quando deixa de haver cria na colmeia (Branco *et al.* 2006).

A partir do início do tratamento, Figura 15, é visível uma maior variabilidade na percentagem de queda de varroa entre colónias no grupo que ficou sem rainha, este aspecto pode estar relacionado com o facto da distribuição da varroa na criação não ser homogénea, o que determina que no nascimento de certa área de cria nasçam mais ácaros, e consequentemente, morram mais (Fuchs & Langembach, 1989). Outro dado que pode ser importante é o facto de haver uma diminuição da área de postura nas colónias que terá começado por esta altura, levando a uma diminuição da taxa de reprodução das varroas. No grupo com rainha esta maior variabilidade verifica-se na fase inicial, na altura em que há criação a nascer. A maior variabilidade verificada na

fase inicial das curvas, visível na Figura 14, poderá ser explicada pelo facto de grande parte da população de varroas (65% a 85%) (Martin, 1998) se encontrar na cria operculada, que quando nascem deixam de estar protegidas contra o tratamento levando ao aumento do número de varroas mortas, por outro lado a varroa não está distribuída de forma uniforme na criação (Martin & Kemp, 1997 citado em Martin, 1998).

Dentro de cada grupo o factor colónia não foi significativo, isto é, não existe nenhum efeito intrínseco à colónia ou relacionado com a posição em que cada colmeia se encontra, no entanto, o facto de ter ou não ter rainha é importante para explicar a percentagem acumulada de queda de varroa em relação ao total.

A construção de um modelo empírico com o intuito de perceber quais eram as variáveis que mais influência tinham sobre a percentagem acumulada de ácaros mortos, revelou serem significativas variáveis intrínsecas às colónias, como área de postura no início e no final, ter ou não ter rainha e a estimativa da população inicial de ácaros, e variáveis extrínsecas às colónias, como temperatura média, precipitação e insolação. Tanto a temperatura média como a insolação têm um efeito negativo sobre a percentagem acumulada de ácaros caído. O efeito negativo da insolação e temperatura poderá justificar-se por uma maior quantidade de ácaros mortos devido ao tratamento na altura em que os dias ficaram mais curtos, o que leva a uma menor actividade das abelhas, (Figuras 17 e 18). Nesta época do ano com a descida da temperatura as abelhas ficam na colmeia formando um cacho de forma a manter a temperatura interna da colmeia (Southwick, 1982; Omholt & Lonvik, 1986; Sumpter & Broomhead, 2000; Stabentheiner *et al.* 2003), sendo possivelmente mais difícil aos ácaros caírem ou morrerem devido ao tratamento químico.

3. Parte II: Óleo essencial de *Mentha cervina*

3.1 Introdução

O óleo essencial é constituído por compostos voláteis naturais de caracterização complexa, com um odor intenso, formados no metabolismo secundário das plantas aromáticas. Estes compostos são líquidos, lipídicos, voláteis à temperatura ambiente, raramente coloridos, lipossolúveis e solúveis em solventes orgânicos, têm uma densidade inferior à da água e podem ser sintetizados em vários órgãos das plantas: gomos, folhas, flores, casca e raízes. Após a sua síntese são armazenados em sementes, cavidades e tricomas glandulares (Bakkali *et al.* 2008). Na natureza desempenham um papel muito importante na protecção das plantas contra agentes infecciosos ou predadores como os herbívoros. Possuem propriedades bactericidas, fungicidas, insecticidas, virucidas, acaricidas entre outras (McConkey *et al.* 2000). Podem ter uma acção atractiva ou repelente sobre os insectos consoante os compostos e as espécies, actuando como sinomonas, alomonas ou cairomonas.

Os óleos essenciais são uma mistura natural muito heterogénea, com vários componentes, em diferentes concentrações e em que todos se caracterizam por apresentarem um baixo peso molecular. Os componentes que se encontram em maiores concentrações geralmente determinam as propriedades biológicas do óleo essencial. Os componentes dos óleos essenciais incluem-se em dois grupos principais com biossíntese distinta: um grupo de terpenos e terpenóides, e um outro grupo, menos importante, de constituintes alifáticos ou aromáticos. Em geral, os terpenos são os principais constituintes dos óleos essenciais (Bakkali *et al.* 2008).

Os terpenos são hidrocarbonetos, com um conjunto muito variado de compostos, responsáveis pelos constituintes odoríferos encontrados nas plantas. Todos os compostos terpénicos podem ser considerados, estruturalmente como polímeros do isopreno. O pirofosfato isopentenil é produzido nos plastídeos dos tricomas glandulares de óleos essenciais de várias plantas, e são os constituintes primários que dão origem aos terpenos e aos óleos essenciais. As unidades de isopreno juntam-se dando origem aos vários tipos de terpenos, os quais podem ser ainda submetidos a uma ou mais transformações do metabolismo secundário, como oxidação, redução, isomerização,

conjugação entre outros (Betts, 2001). Apresentando a fórmula estrutural $(C_5H_8)_n$ os terpenos classificam-se de acordo com o número de unidades isoprenicas, de: Hemiterpenos (C_5), Monoterpenos (C_{10}), Sesquiterpenos (C_{15}), Diterpenos (C_{20}), Sesterpenos (C_{25}), Triterpenos (C_{30}) e Tetraterpenos (C_{40}), sendo os Monoterpenos e os Sesquiterpenos os terpenos mais importantes e também os que apresentam maior volatilidade dado o seu menor peso molecular (Campos & Mourato, 2002).

Os monoterpenos resultam do acoplamento de duas unidades de isopreno (Figura 20), são as moléculas mais representativas nos óleos essenciais, representando cerca de 90%, com uma grande variedade de estruturas, variando de acordo com os radicais: aldeídos, estéres, cetonas, entre outros, que depois podem variar no tipo, em: acíclicos, monocíclicos e bicíclicos. Os sesquiterpenos são formados a partir da ligação de três isoprenos. A extensão da cadeia aumenta o número de locais de ligação o que permite uma maior variedade de estruturas, semelhantes a dos monoterpenos (Bakkali *et al.* 2008).

Nos compostos aromáticos, incluem-se o benzeno e todos os compostos que apresentam na sua estrutura um núcleo benzénico ou outros anéis com características idênticas, ocorrendo nas plantas com menor frequência que os terpenos. Os compostos aromáticos incluem grupos funcionais como: aldeídos, álcool, fenóis, derivados de Metoxi e compostos de dioxi de metileno (Campos & Mourato, 2002).

As vias relativas à biossíntese de terpenos e compostos aromáticos na planta geralmente são separadas no entanto, em algumas plantas podem coexistir e assumir um caminho importante como é o caso da canela, erva-doce, óleo de cravo entre outros (Bakkali *et al.* 2008).

A síntese dos óleos essenciais e constituição destes são afectados por factores de desenvolvimento da planta e factores ambientais, sendo os níveis de produção dos óleos controlados a nível genético através da regulação bioenzimática (Sangwant *et al.* 2001).

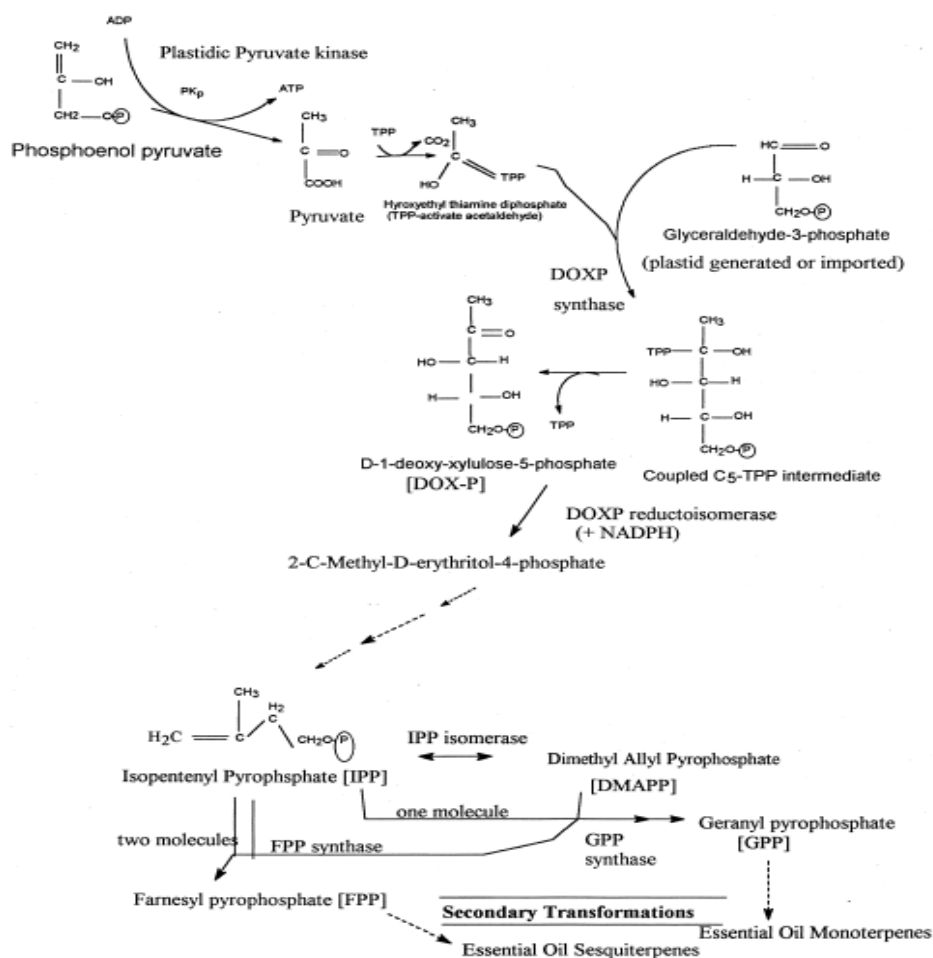


Figura 20: Esquema da síntese do pirofosfato isopentenil (isopreno) estrutura base da formação dos terpenos, a partir do metabolismo primário das plantas; Fonte: Sangwan *et al.* 2001

A volatilização destes compostos é muito baixa, na ordem de 1% por mês, em relação ao total armazenado, porque as folhas não desenvolveram nenhum mecanismo de libertação ou volatilização. A acumulação e concentração destas substâncias variam ao longo dos estágios de vida, isto é, na fase juvenil das folhas existem determinados compostos que vão desaparecendo ou diminuindo de concentração à medida que as folhas vão envelhecendo e por outro lado vão surgindo novos compostos (Gershenzon et al. 2000). No caso da *Mentha piperata* L. a acumulação de monoterpenos é encontrada de forma restrita nas folhas de 12 a 20 dias de idade, o período de máxima expansão foliar (Sangwan *et al.* 2001).

3.2 Encapsulamento

Microencapsulamento é um processo pelo qual partículas de ingredientes activos em estado gasoso, líquido ou sólido são empacotados dentro de um segundo material, de forma a proteger essa mesma substância, dando origem a microcápsulas. As microcápsulas têm um tamanho que varia entre 0,2µm e 5000µm. O conteúdo interno pode ser designado por núcleo, material protegido, ingrediente, substrato ou agente activo. O material de revestimento, geralmente, é designado por, portador, parede, revestimento ou matriz.

A matriz pode ser seleccionada a partir de uma ampla variedade de recursos naturais (proteínas, gomas, amido, amidos modificados, entre outros) ou polímeros sintéticos, dependendo do agente activo e das características desejadas no final. Sendo as microcápsulas formuladas de acordo com a expectativa de que o núcleo deve ser libertado de forma controlada, podendo ser relativamente rápida, abrupta, ou gradual. A libertação, geralmente, depende da geometria e do material de revestimento usado (Beristain *et al.* 2001). Quando a estrutura é esférica as micropartículas podem ser classificadas como microcápsulas ou microesferas. As microesferas diferem das microcápsulas, pelo facto de constituírem um sistema matricial, no qual o polímero forma uma rede tridimensional onde o material a ser microencapsulado pode estar absorvido, incorporado ou ligado. As microcápsulas são constituídas por uma parede contínua de polímero que encerra no seu interior um volume vazio onde pode ser protegida a substância activa.

Os métodos de microencapsulamento podem ser classificados de acordo com as técnicas utilizadas. Nos métodos físico-químicos são utilizadas técnicas envolvendo emulsificação, nos métodos químicos a polimerização interfacial e a gelificação e nos métodos mecânicos o revestimento em turbinas, a suspensão no ar ou leito fluido, a centrifugação em multi-orifício e a secagem por “spray drying” (Barros & Stringheta, 2010). A técnica de “spray drying” tem sido amplamente utilizada na protecção de alimentos sensíveis ao calor, produtos farmacêuticos, entre outros por ser uma técnica económica, flexível e contínua (Valduga, 2007). Esta técnica de secagem pode ser utilizada como método de encapsulamento quando retém material activo dentro de uma matriz, constituída pelo material encapsulante. A secagem permite transformar um produto em estado líquido em partículas sólidas pulverulentas, o produto obtido deve

apresentar o máximo de características do produto inicial e protegê-lo das características adversas do meio.

O microencapsulamento utiliza-se para satisfazer os seguintes objectivos:

- Protecção do produto no que respeita a temperatura, a humidade, a luz e o oxigénio da atmosfera;
- Diminuição da evaporação ou taxa de transferência do material do núcleo para o exterior;
- Facilitar a utilização da substância;
- Mascarar propriedades indesejadas;
- Controlar a taxa de libertação do material do núcleo sob condições desejadas.

Os óleos essenciais são misturas heterogéneas de compostos voláteis quimicamente instáveis na presença de ar, luz, humidade e altas temperaturas, pelo que o microencapsulamento pode resultar uma técnica importante de protecção das respectivas características. O microencapsulamento, nestes casos, é assim usado para controlar a libertação dos compostos voláteis, prevenir a degradação química bem como a interacção com componentes incompatíveis (Beristain *et al.* 2001).

3.3 Efeito insecticida e acaricida dos óleos essenciais

Cerca de 150 óleos essenciais ou seus componentes foram já testados para controlar o ácaro *Varroa destructor*. Têm sido testados compostos provenientes de plantas distintas como o tomilho, rosmaninho, segurelha, menta, entre outras (Ariana *et al.* 2002), com bons resultados. Foram ainda testados vários factores, como a toxicidade, o efeito atraente ou repelente do composto sobre o ácaro e a influência do óleo na reprodução do ácaro. Para além dos factores anteriores têm sido testados diferentes formas de aplicação, localmente, em pulverização ou de forma passiva como a evaporação (Imdorf *et al.* 2003). Sabe-se que numerosos factores afectam a eficácia dos óleos essenciais, tais como a concentração em que se encontram determinados compostos, sendo este um dos principais factores que afectam a eficácia, o método de aplicação utilizado, a duração do tratamento, o grau de maturidade em que a planta se encontra na altura da sua recolha, o local de recolha, dado que a produção de compostos varia com a localização geográfica e as condições de desenvolvimento, entre outros factores (Regnault-Roger *et al.* 1993; Calderone & Spivak, 1995). De forma a conhecer e controlar a maior parte destes factores são necessários vários estudos para testar os reais

efeitos destes produtos em diferentes condições (Neira *et al.* 2004). Um dos aspectos observados por Calmasur *et al.* (2006) é que o efeito acaricida e insecticida aumentam com a dose e com o prolongamento do tempo de exposição.

Alguns óleos essenciais e/ou seus constituintes têm demonstrado um amplo espectro de actividade contra insectos e ácaros, fungos fitopatogénicos e nematódes. Assim, têm um potencial de utilização considerável na protecção de culturas e gestão de pragas em várias situações, como, por exemplo, no controlo de pragas urbanas (Isman, 2000). Um estudo realizado com os vapores de óleo essencial de *Micromeria fruticosa* L., *Nepeta racemosa* L. e *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae), foram testados com sucesso em pragas hortícolas e ornamentais. Os dados mostraram que os óleos essenciais das três plantas têm potencial para serem utilizados na gestão das pragas *Tetranychus urticae* Koch e *Bemisia tabaci* Genn., em condições equivalentes às verificadas em estufa (Calmasur *et al.* 2006). Setkaya *et al.* (2010) utilizaram com sucesso os óleos *Origanum onites* L., *Thymbra spicata* L. subsp. *spicata*, *Lavandula stoechas* L. subsp. *Stoechas* e *Mentha spicata* L. contra ácaros *Tetranychus cinnabarinus* Boisduva.

Um aspecto importante nos compostos dos óleos essenciais é a sua selectividade na acção sobre os invertebrados, no entanto, esta não está bem documentada. Ainda assim foi observado que as abelhas parecem pouco sensíveis a certos óleos, dentro de certas gamas de concentração. Por outro, lado o facto de haver pouca sobreposição dos insectos afectados por diferentes óleos ou componentes destes, revela que apesar destas substâncias serem activas contra um largo espectro de pragas, a sua toxicidade é algo específica. Os óleos e os seus constituintes actuam de forma muito directa e específica sobre os indivíduos de determinadas espécies e em certos estados larvares (Isman, 2000).

Uma das grandes vantagens da utilização dos óleos essenciais na luta contra pragas é o facto de não serem prejudiciais para o ambiente nem para o utilizador. Muitas das plantas produtoras de óleos essenciais são comumente utilizadas como ervas aromáticas em determinadas regiões, não sendo tóxicas para os humanos a baixas concentrações (Isman, 2000; Kéita *et al.* 2000).

Na apicultura, um dos constituintes dos óleos essenciais que melhores resultados tem obtido na luta contra a varroa é o timol, extraído da planta de tomilho *Thymus vulgaris* L. No entanto, a quantidade e a qualidade deste está dependente de uma série de factores como o ecótipo de planta que lhe deu origem e o método como é feita a extracção, o que implica diferente eficácia acaricida sobre a varroa. Este composto tem

mostrado uma eficácia na morte dos ácaros entre os 66-98%, sendo tão eficaz quanto o ácido fórmico numa série de testes efectuados. Outro aspecto importante é o facto de não matar um número significativo de abelhas. Os testes efectuados revelam que é mais eficaz quando não há criação na colónia (Goodwin & Eatton, 1999). Por outro lado, os resultados do timol estão muito dependentes da temperatura a que é aplicado, a temperaturas muito altas evapora-se rapidamente e a temperaturas muito baixas a sua libertação é baixa, pode ainda deixar resíduos na cera e no mel apesar de não persistirem durante muito tempo, pelo que a sua aplicação deve ser feita depois do fluxo de mel (Goodwin & Eatton, 1999).

Vários outros óleos essenciais têm sido testados embora nenhum com aplicações comerciais. Trabalhos realizados com óleos essenciais de *Tagetes minuta* L., *Heterotheca latifolia* Buchley e eucaliptol, revelaram que os dois últimos foram mais eficazes sobre a varroa em colónias de abelha, com os valores de eficácia dos tratamentos a situarem-se aproximadamente nos 63-84% (Ismail *et al.*, 2006; Ruffinengo *et al.*, 2007). Outro aspecto positivo foi a baixa mortalidade das abelhas para os óleos de *Tagetes minuta* e *Heterotheca latifolia*, já no caso do eucaliptol a taxa de morte das abelhas foi elevada, até 70% (Ismail *et al.*, 2006; Ruffinengo *et al.*, 2007). Num outro estudo observou-se que óleos de *Lavandula officinalis* L. e *Laurelia sempervirens* Ruiz & Pavón, faziam cair as varroas das abelhas, no entanto, a taxa de mortalidade destas foi apenas de 42% e 35% respectivamente (Neira *et al.*, 2004). Gal *et al.* em 1992 obtiveram 82% e 91% de mortalidade da varroa com óleos essenciais de orégãos, (Kraus *et al.*, 1994) obteve 73% para óleo de citrina e 98% com óleo de canela. Já o óleo de *Syzygium aromaticum* L., que tem como principal componente o Eugenol (86.7%), quando colocado em contacto com a varroa tem um efeito atractivo sobre estas (Maggia *et al.*, 2010).

O principal objectivo do presente estudo foi de testar o óleo essencial da *Mentha cervina* L. determinando-se o seu efeito ácaricida na varroa, e o seu uso potencial como forma de luta bioquímica nas colónias de *Apis mellifera*.

A hortelã-da-ribeira, *Mentha cervina* L. também conhecida por poejo-fino e erva-peixeira, é um protohemicriptófito de 10-40 cm, de caules prostrados e radicantes inferiormente, erectos acima. Possui folhas com 10-25 x 1-4 mm, linearmente oblanceoladas, atenuadas na base, sésseis, glabras, inteiras ou sinuado-dentadas; brácteas mais largas que as folhas; cálice com 2-3 mm, de dentes triangulares prolongados num espinho esbranquiçado; corola com 5-6 mm, lilacínea ou branca;

mericarpos ovóide-oblongos e lisos (Franco, 1984). A *Mentha cervina* é uma planta vivaz, estolhosa, que ocorre em sítios húmidos e pantanosos (Monteiro *et al.* 2008), em Portugal, inicia o seu desenvolvimento na Primavera, floresce durante o Verão e, completa o seu ciclo de vida em sete meses (Belchior, 2009). É da família *Lamiaceae* (Labiadas) (Belchior, 2009) e tem uma longa história como planta aromáticas e medicinais em Portugal (Monteiro *et al.* 2008). Pertence ao género *Mentha* L. o qual se distribui por zonas temperadas e sub-temperadas, com origem no Mediterrâneo (Belchior, 2009).

Existindo um efeito acaricida no óleo essencial da *Mentha cervina*, levanta-se ainda a questão de quais dos compostos libertados mais actuariam sobre a varroa. Para tal, foi realizado um segundo ensaio em que uma esponja com óleo ia passando de caixa em caixa a intervalos regulares. Estes resultados foram tidos em conta na formulação do encapsulamento, de forma a maximizar a libertação dos compostos com maior efeito acaricida, a fim de se otimizar os resultados.

3.4 Material e métodos

3.4.1 Óleo essencial de *Mentha cervina*



Figura 21: Extracção do óleo essencial de *Mentha cervina* em destilação por vapor; Fonte: autor

A parte prática referente a esta parte do trabalho foi realizada: no Herbário, no PAI (Pavilhão de Agro Industrias), pertencentes ao Instituto Superior de Agronomia e no Posto Apícola, situados na Tapada da Ajuda e pertencente ao INRB (Instituto Nacional de Recursos Biológicos), o Posto Apícola foi o local de recolha das varroas para os ensaios, no PAI foram feitas as extracções e o encapsulamento do óleo essencial, e no Herbário foram feitas as experiências e o armazenamento do material.

O óleo essencial de *Mentha cervina* foi obtido por destilação do material vegetal, cultivado em Torres Vedras e colhido em floração no ano de 2009, foi seco e armazenado em laboratório até

Janeiro de 2010, altura em que foi feita uma separação do material a utilizar na extracção do óleo essencial. A extracção foi efectuada a partir das folhas e flores, pelo processo de hidrodestilação em aparelho de arrastamento por vapor (Figura 21). Após a extracção, o óleo essencial foi conservado a -18°C , para manterem as suas propriedades ao longo do tempo.

O óleo essencial foi caracterizado por GC-MS para conhecer os constituintes e suas proporções (Quadro 2).

3.4.2 Captura das Varroas

A captura das varroas vivas foi feita em quadros com criação de zangãos, prestes a nascer, dos quais eram retiradas as pupas de zangão (Figura 22) com uma pinça. As varroas vinham agarradas às pupas ou ficavam nas paredes dos alvéolos, onde eram retiradas com o auxílio de uma pinça. Todas as varroas capturadas vivas foram colocadas dentro



Figura 22: Pupa de zangão com varroas; Fonte: autor

de um recipiente de vidro onde foram transportadas para o laboratório. Juntamente com as varroas eram colocados nos recipientes alguns zangãos previamente capturados e algumas pupas, com a função de proteger e alimentar as varroas para que estas se mantivessem em bom estado até à realização dos ensaios. Esta operação foi feita tendo algum cuidado para não danificar nem matar as varroas. As pupas devem estar num estado de desenvolvimento avançado e prestes a nascer, para que a quitina já esteja em formação ou formada e não se romper. Quando a pupa não tem ainda a quitina formada a película que a envolve é muito frágil e rompe-se com muita facilidade provocando a libertação de fluidos larvares, o que ao acontecer dentro do recipiente de transporte mataria as varroas que se encontram na base do recipiente. Se a população de varroas nas colónias for considerável, o número de varroas que se encontra em cada pupa é maior, o que facilita o trabalho e reduz o tempo de captura das varroas.

Outro método utilizado foi a colocação de tabuleiros de recolha em estrado de rede metálica. Os tabuleiros eram colocados durante algumas horas, entre 12 a 24 horas antes

da recolha das varroas, depois eram inspeccionados e as varroas vivas e em bom estado eram recolhidas para dentro dos recipientes de transporte. Os recipientes de transporte não eram tapados por completo, para evitar a morte dos zângãos e das varroas.

No laboratório as varroas eram novamente seleccionadas de forma a não colocar varroas em mau estado nas caixas do ensaio.

3.4.3 Experiência 1: Óleo essencial de *Mentha cervina* em esponja

Este ensaio tinha como objectivo testar o efeito acaricida do óleo essencial obtido da *Mentha cervina* sobre as varroas. Foram utilizadas três doses de óleo: 10µl, 7.5µl e 5µl. Para cada dose foram feitas quatro repetições. O óleo essencial foi colocado com o auxílio de uma pipeta sobre um quadrado de esponja, do tipo limpa bancadas (Figura 23), com uma área de 1,5 cm². A esponja foi depois colocada nas tampas de caixas plásticas com fita-cola, esta era colocada num lado da esponja que ficava encostado a tampa da caixa, deixando a restante superfície livre, sem impedir a libertação do óleo essencial. As caixas utilizadas eram transparentes, de fundo quadrado com 10,5cm de lado e 6,5cm de altura, volume de 716,6cm³ (Figura 24). Às caixas com óleo essencial acrescentou-se três caixas em branco, isto é sem adicionar óleo essencial, dando um total de 15 caixas. Em cada uma das caixas foram introduzidas varroas juntamente com alguns zangãos que serviam para protecção, fonte de alimento para as varroas e, por outro lado, permitiam obter informação sobre a reacção dos zangãos ao contacto com as diferentes quantidades de óleo. Devido ao número reduzido de zangãos disponíveis este estudo não pode ser feito de um forma quantitativa limitando-se a registos de observações de comportamento.



Figura 23: Esponja utilizada no ensaio com o óleo essencial; Fonte: autor



Figura 24: Caixas utilizadas na realização dos ensaios; Fonte: autor

As caixas de cada grupo foram tapadas ao mesmo tempo e registada a hora. A cada 15 minutos eram feitas observações de forma a monitorizar o efeito do óleo essencial sobre as varroas e verificar o comportamento dos zângãos. A temperatura dentro do laboratório durante a experiência foi de 20°C, tendo permanecido constante.

Foram consideradas varroas mortas, todas as varroas que permanecem imóveis mesmo após o toque.

3.4.4 Experiência 2: Volatilização do óleo essencial de *Mentha cervina*

Este ensaio tinha como objectivo monitorizar em que momentos do tempo são libertados os compostos com efeito acaricida sobre as varroas. Para tal, foram preparadas sete caixas com uma média de 10 varroas e 3 zangãos por caixa (Figura 25). Foi preparada uma esponja com 5µl de óleo essencial de *Mentha cervina* como descrito na experiência 1 e colada numa das tampas. A primeira caixa foi fechada com a tampa que continha a esponja com o óleo essencial e foi registada a hora de início. Ao fim de 15 minutos a tampa passou para a caixa 2 e assim respectivamente, até a caixa 7. Após ter recebido o óleo essencial durante 15 minutos a caixa 1 é tapada com uma tampa sem óleo essencial e feita uma contagem das varroas mortas, a intervalos periódicos. Passados 15 minutos a caixa 1 voltava a ser contada, a caixa 2 é tapada com uma tampa sem óleo essencial, é feita a contagem de varroas mortas, e a tampa com óleo essencial passa para a caixa 3, e assim, respectivamente, até a caixa 7. A temperatura no laboratório foi constante durante o ensaio, 23°C.



Figura 25: Foto de uma das caixas do ensaio da volatilização vista de cima; Fonte: autor

3.4.5 Encapsulamento

O encapsulamento foi feito no PAI, em solução de base de amido. Após a preparação da solução, esta passou pelo “*Spray drying*” para secar, tendo sido obtido o encapsulado seco na forma de pó, o qual foi recolhido num recipiente de vidro, que em seguida era tapado e bem vedado para não haver libertação do encapsulado (Figura 26). Por cada preparação obteve-se uma média de 10g de encapsulado, durante o processo há algumas perdas de material que fica retido nas componentes do aparelho.



Figura 26: Frasco de recolha e acondicionamento do encapsulado; Fonte: autor

3.4.6 Experiência 3: Óleo essencial de *Mentha cervina* encapsulado



Figura 27: Encapsulado e dois zangãos no ensaio com o óleo essencial encapsulado; Fonte: autor

Neste ensaio o objectivo era testar a acção do óleo essencial encapsulado sobre as varroas, para tal, foram utilizadas quatro doses de encapsulado: 2g, 1g, 0.5g e 0.25g. Para cada quantidade de encapsulado foram feitas 3 repetições, fizeram-se ainda 5 repetições em branco, dando um total de 17 caixas. Todas as caixas

continham entre 7 a 13 varroas, juntamente com 3 a 4 zângãos (Figura 27 e 28), com os objectivos acima descritos. As varroas e os zângãos foram colocados dentro de caixas plásticas idênticas às experiências anteriores.

Após ter sido colocado o encapsulado dentro da caixa, foi registada a hora de fecho, e de 15 em 15 minutos eram feitas observações do número de varroas mortas.



Figura 28: Zangão transportando uma varroa e ao canto mais duas varroas; Fonte: autor

3.4.7 Tratamento dos dados

Os dados foram tratados no Excel versão 2003 e no programa SPSS versão 1.17. No Excel foram calculadas as taxas de sobrevivência para cada um dos ensaios em cada caixa. Depois de obtida a taxa de sobrevivência foram construídos os gráficos com as curvas de sobrevivência (Anexo II).

No SPSS foram feitas análises de sobrevivência utilizando o estimador de Kaplan-Meier e o teste de Log-Rank. O teste de Log Rank faz a comparação entre os vários tratamentos de cada ensaio testando se existem diferenças significativas entre tratamentos. O estimador de Kaplan-Meier estima a taxa de sobrevivência e o desvio padrão associado aos diferentes momentos do tempo em cada tratamento, dá-nos ainda o tempo médio e a mediana de sobrevivência, desvio padrão e um intervalo de confiança para o tempo médio de sobrevivência a 95%, para cada tratamento. Com base nos dados obtidos no teste de Kaplan-Meier foram construídas curvas de sobrevivência no Excel.

3.4.8 Dificuldades encontradas na realização prática deste trabalho

As maiores dificuldades encontradas nesta parte do trabalho prenderam-se com a captura e transporte das varroas em bom estado e em número suficientes para a realização dos ensaios. Por outro lado, o número de varroas que eram introduzidas em cada caixa foi difícil de controlar, porque ao serem transportadas com os zângãos estas escondiam-se sobre estes, tornando-se difícil a sua contagem, por vezes mesmo a sua visualização, daí o número de varroas não ser igual para todas as caixas, como inicialmente estava previsto.

3.5. Resultados

3.5.1 Ensaio 1 com o óleo essencial em esponja

Na observação directa do comportamento dos zângãos aquando da aplicação do óleo essencial nas caixas dos ensaios (Figura 29), foi visível que estes reagiam de forma negativa. Ficavam muito agitados, tentando sair de dentro das caixas, durante os primeiros 15 minutos após a introdução das esponjas com o óleo essencial, até que se iam acalmando. Este comportamento foi mais acentuado nos tratamentos com as quantidades mais elevadas de óleo essencial 10µl e 7.5µl. Nas caixas que receberam a dose mais baixa de óleo essencial, 5µl, o comportamento dos zângãos não foi perceptivelmente alterado, permanecendo tranquilos.



Figura 29: Foto das caixas no ensaio com o óleo essencial; Fonte: autor

Tanto o tempo médio de sobrevivência como a taxa de sobrevivência ao fim de 65 minutos foram idênticos nos três tratamentos com diferentes doses de óleo essencial, que, por sua vez foram significativamente inferiores aos valores observados no controlo (Figuras 30 e 31.)

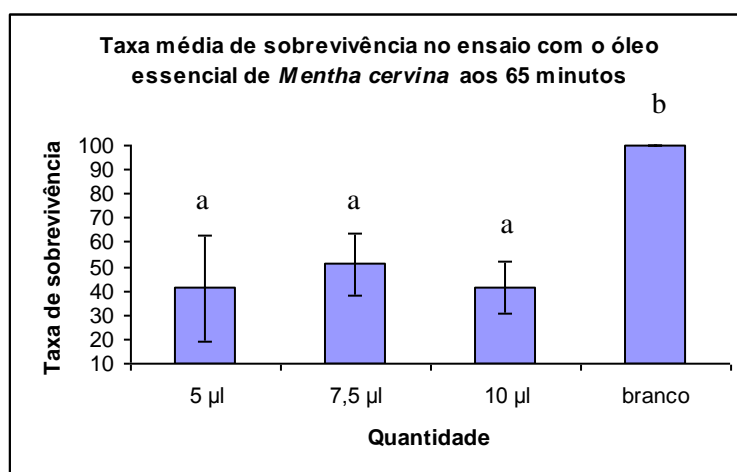


Figura 30: Tempo médio (minutos) de sobrevivência (\pm e.p.) da varroa após ter sido aplicado o óleo essencial. Barras com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0.05$).

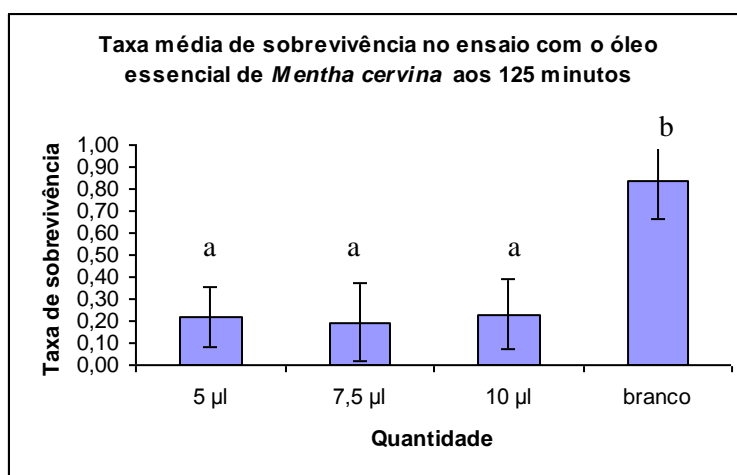


Figura 31: Taxa média de sobrevivência (\pm e.p.) ao fim de 65 minutos após a aplicação do óleo essencial de *Mentha cervina*. Barras com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0.05$).

A taxa de sobrevivência da varroa decresceu exponencialmente ao longo do tempo nos vários tratamentos, sendo muito semelhante nas várias doses que não diferiram significativamente entre si (Figura 31 e 32, Quadro 1). Por outro lado, todas as doses diferiram significativamente das caixas controlo. Estas apresentavam uma taxa de mortalidade de apenas 15% ao fim de 75 minutos, após os 75 minutos não houve mortalidade. Neste mesmo período a taxa média de mortalidade nas caixas com óleo essencial era de cerca de 60% (Figura 32).

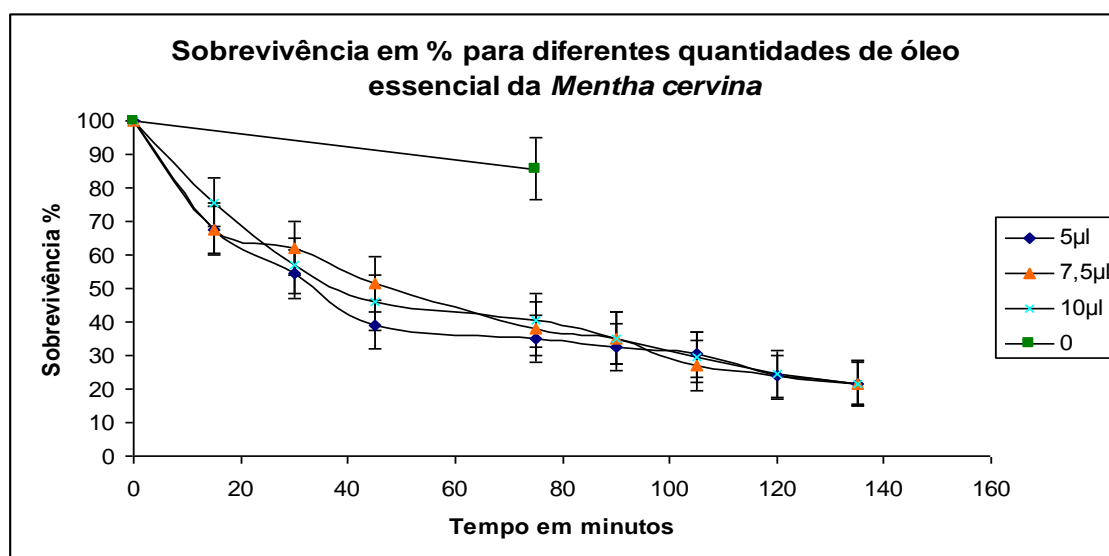


Figura 32: Percentagem média de sobrevivência (\pm e.p.) da varroa ao longo do tempo e o desvio padrão, no ensaio com o óleo essencial de *Mentha cervina*.

Quadro 1: Resultados do teste de Log-Rank (Mantel-Cox) para a comparação entre tratamentos no ensaio do óleo essencial de *Mentha cervina*.

Tratamento	0		5µl		7.5µl	
	Chi-Square	Sig.	Chi-Square	Sig.	Chi-Square	Sig.
0						
5µl	15,795	,000				
7.5µl	15,076	,000	,047	,828		
10µl	15,336	,000	,030	,862	,007	,933

3.5.2 Tempo de volatilização do óleo essencial

Neste ensaio o principal objectivo era perceber em que altura do tempo se libertavam os compostos que actuavam sobre as varroas, matando-as. Nas caixas 5 (60-75 minutos) e 7 (90-105 minutos) não se registou qualquer mortalidade. Na análise de sobrevivência excluíram-se estas caixas.

Os resultados evidenciam uma maior mortalidade ao fim de 1 hora de exposição na caixa 4 (45-60 minutos), seguida da caixa 3 (30-45 minutos) e caixa 2 (15-30 minutos) (Figura 33). O tempo significa a altura em que as varroas estiveram expostas à esponja com o óleo essencial, após o início da volatilização. Este resultado evidencia que são os compostos volatilizados entre 30 a 60 minutos, após a colocação do óleo essencial na esponja, aqueles que mais afectam as varroas.

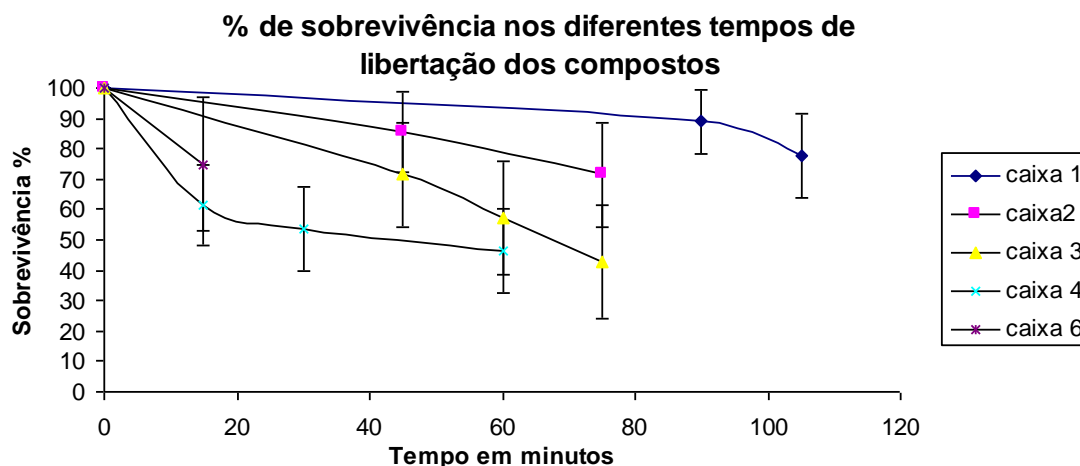


Figura 33: Percentagem média (\pm e.p.) de sobrevivência nos diferentes tempos de libertação dos compostos. Caixa 1: 0-15 minutos; Caixa 2: 15-30 minutos; Caixa 3: 30-45 minutos; caixa 4: 45-60 minutos; caixa 6: 75-90 minutos.

Quadro 2: Composição do óleo essencial da *Mentha cervina*.

<i>Mentha cervina</i>		
População: Cultivada		
Componentes	RI	Média
3-Metil-ciclo-hexanona		0,0
α -Tugeno	924	0,0
α -Pineno	930	0,5
Canfeno	938	0,0
Sabineno	958	0,0
3-octanona		0,0
β -Pineno	963	0,5
2,5-Dimetil-1-hexeno*	970	0,0
3-Octanol	974	0,0
Mirceno	975	0,0
<i>p</i> -Cimeno	1003	0,1
1,8-Cineol	1005	0,0
Limoneno	1009	3,8
<i>cis</i> -b-Ocimeno	1017	0,0
<i>trans</i> -b-Ocimeno	1027	0,0
γ -Terpineno	1035	0,0
<i>n</i> -Octanol	1045	0,0
<i>cis</i> -Óxido de linalol	1045	0,0
<i>trans</i> -Óxido de limoneno	1112	0,0
Mentona	1120	1,0
Isomentona	1126	14,7
Mentofurano		0,0
<i>cis</i> -Isopulegona	1134	1,0
Terpineno 4-ol		0,0
Verbenona	1164	0,0
Mirtenol	1168	0,0
Pulegona	1210	77,7
Piperitona*	1211	0,0
Carvotanacetona*	1222	0,0
Piperitenona	1,62	0,0
<i>trans</i> - β -Cariofileno	0,26	0,1
Óxido de β -Cariofileno	0,00	0,0
Epóxido de humuleno	0,00	0,5
% Identificação	26286,88	99,90
RI-Índice de retenção		

RI - Índice de Retenção de um componente é um número, obtido por interpolação, relacionando o tempo de retenção do componente em estudo com o tempo de retenção de dois compostos padrões (geralmente hidrocarbonetos) eluídos antes e após o pico do composto de interesse (Viegas & Bassoli 2007).

Média - Corresponde a percentagem média de componente libertado.

3.5.3 Ensaio com o óleo essencial encapsulado

Quando este ensaio foi realizado já sabíamos que o óleo essencial da *Mentha cervina* afecta as varroas, e que os principais compostos que actuam sobre a varroa causando mortalidade, libertam-se entre 30 a 60 minutos após a sua aplicação (c.p.f. 3.5.3). Aquando da formulação do encapsulamento foram tidos estes factores em conta, de forma a maximizar no tempo o efeito destes compostos. Quer o tempo médio de sobrevivência quer a taxa média de sobrevivência foram significativamente inferiores nas caixas com encapsulado relativamente ao controlo (Figuras 34 e 35).

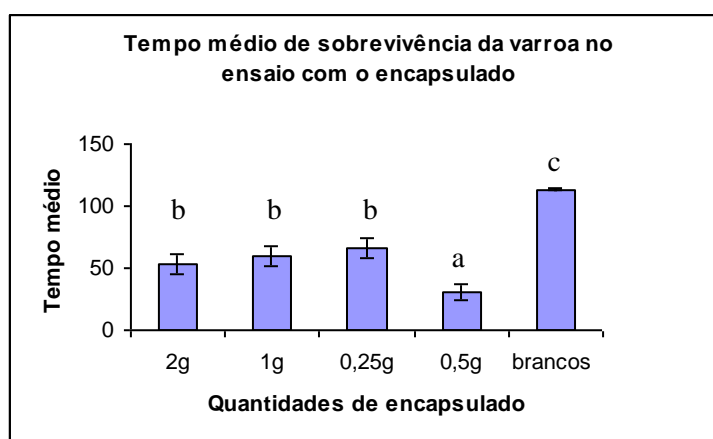


Figura 34: Tempo (minutos) médio (\pm e.p.) de sobrevivência da varroa no ensaio com o encapsulado. Barras com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0.05$).

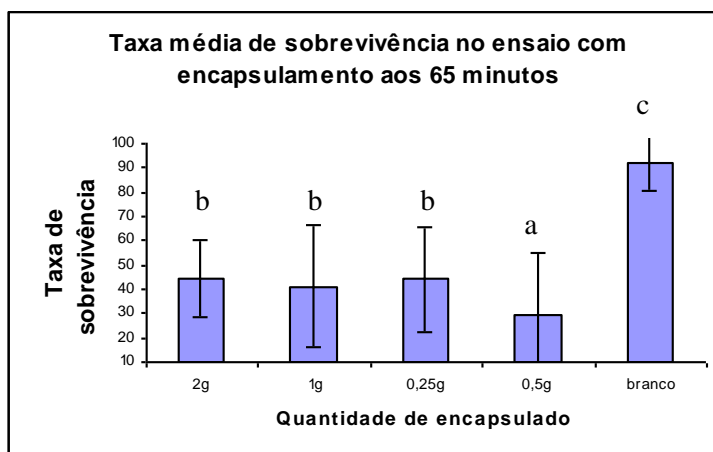


Figura 35: Taxa média de sobrevivência (\pm e.p.) de varroas aos 65 minutos no ensaio com o óleo essencial encapsulado. Barras com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Verifica-se uma redução significativa da sobrevivência com o tratamento relativamente ao controlo para qualquer dose testada, tendo sido, todavia maior para a dose intermédia

de 0.5g quando comparada com as doses 2g e 1g. (Figuras. 34, 35 e 36, Quadro3). Todos os tratamentos diferiram significativamente do controle.

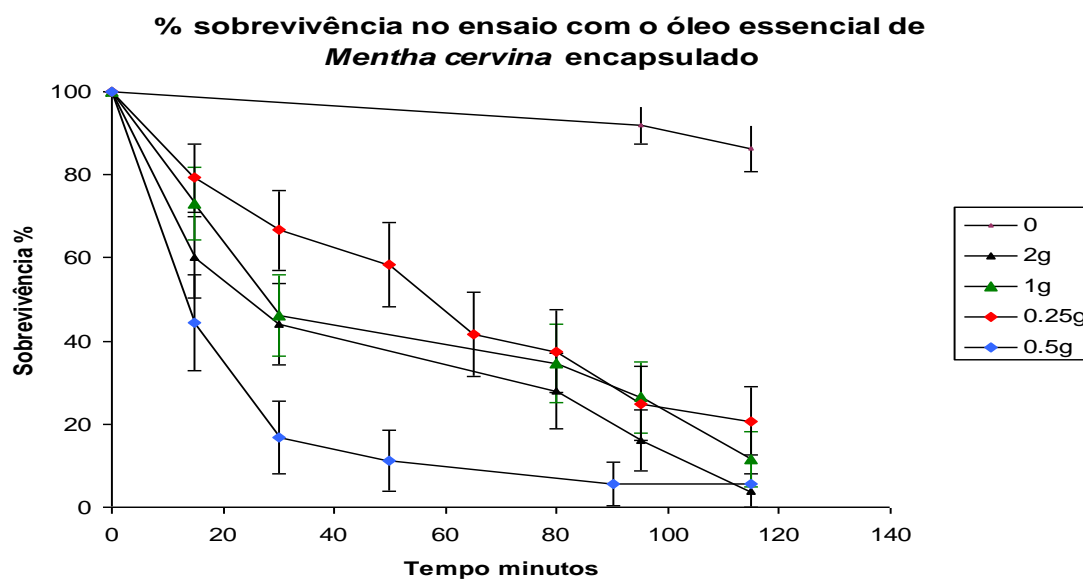


Figura 36: Taxas de sobrevivência para as diferentes doses de encapsulado utilizado no ensaio.

Quadro 3: Estatística do teste de Log-Rank e a comparação entre tratamentos, para o ensaio com o óleo essencial encapsulado.

Tratamento	0		2g		1g		0.25g	
	Chi-Square	Sig.	Chi-Square	Sig.	Chi-Square	Sig.	Chi-Square	Sig.
0								
2g	58,398	,000						
1g	45,702	,000	,983	,322				
0.5g	57,642	,000	2,329	,127	4,907	,027	8,347	,004
0.25g	36,254	,000	1,839	,175	,345	,557		

3.6. Discussão



Figura 37: Recipiente com óleo essencial de *Mentha cervina*; Fonte: autor

Por observação directa das varroas foi visível que o principal efeito do óleo essencial (Figura 37) sobre estas é a nível do sistema nervoso deixando as varroas atordoadas, primeiro num comportamento hiperactivo, libertando-se do hospedeiro, mais tarde acabando por morrer. Esta observação está de acordo com o efeito conhecido dos terpenos sobre a recepção de octopamina no sistema nervosos dos artrópodes (Brattsten, 1983; Phillips *et al.* 1995; Isman, 2000; Kostyukovsky *et al.* 2002; Ikemoto *et al.* 2002; Campiche *et al.* 2006; Gershenson & Dudareva, 2007). No primeiro ensaio com o óleo observa-se que a mortalidade em todos os tratamentos, independentemente da dose, é

significativamente superior à das caixas que não receberam óleo essencial (caixas em branco) (Figura 33). É ainda visível que os tempos médios de sobrevivência para as três quantidades de óleo essencial são muito semelhantes. O valor mais baixo de sobrevivência regista-se para a dose mais baixa de óleo, embora as diferenças não sejam significativas. O que deixa perceber que, nesta situação, a maior quantidade de óleo essencial não traz melhores resultados. Este resultado poderá estar de acordo com a observação de que os óleos essenciais têm uma gama de eficácia muito restrita quando comparados com substâncias químicas sintetizadas em laboratório (Bogdanov *et al.* 1998). Por outro lado, esta observação é contrária ao apresentado por Calmasur *et al.* (2006) onde se observa um aumento do efeito acaricida com a dose e com o tempo de exposição dos vapores dos óleos essenciais de *Micromeria fruticosa*, *Nepeta racemosa* e *Origanum vulgare*, sobre o ácaro *Tetranychus urticae*.

Os valores médios de sobrevivência, no ensaio de volatilização do óleo essencial em esponjas, revelam que os compostos que causam maior taxa de mortalidade nas varroas libertam-se entre os 30 e os 60 minutos, como é visível na Figura 33 em que as taxas de sobrevivência mais baixas estão nas caixas 3 e 4. As diferenças são significativas relativamente à caixa 1 ($p < 0.001$) (Quadro 2). A caixa 4 quando comparada com a caixa 2 (15 minutos) tem um valor muito próximo de ser significativo ($p = 0.08$). A caixa 6

não é significativamente diferente das restantes caixas, no entanto, este resultado pode estar a ser influenciado pelo facto desta caixa ter ficado com um número muito pequeno de varroas (apenas 4 varroas). A sobrevivência nas caixas 3 (30 a 45 minutos) e 4 (45 a 60 minutos) é semelhante. Outro aspecto interessante observado é que os compostos que afectam os zângãos parecem ser os compostos de baixo peso molecular, que são libertados nos primeiros instantes após a aplicação. Pelo contrário, no ensaio da volatilização os compostos que actuam sobre a varroa foram os libertados mais tarde, sugerindo que os compostos que mais afectam os zângãos podem não ser os mesmos que afectam a varroa. Isto pode ter implicações relevantes no uso selectivo de terpenos menos tóxicos para as abelhas, mas mais tóxicos para a varroa. O facto de serem os compostos menos voláteis, de maior peso molecular, que mais afectam as varroas sugere ser a isomentona e/ou a pulegona, os compostos interessantes a analisar, dado que dentro do grupo dos terpenos estes compostos são dos que apresentam maior peso molecular. A acção da pulegona sobre outros artrópodes tem demonstrado que tem uma elevada toxicidade, afectando-os de formas diferentes (Gunderson *et al.* 1985, Harwood *et al.* 1990, Banchio *et al.* 2005), por vezes pode ter um efeito neurotóxico (Grundy & Still 1985) deixando-os stressados (Gunderson *et al.* 1985).

No ensaio com o óleo essencial encapsulado verifica-se uma menor taxa de sobrevivência, igual ou inferior a 5%, ao fim de 2 horas, para as doses de 2g e 0.5g, em comparação com a taxa de sobrevivência observada no ensaio em que o óleo essencial era directamente colocado sobre a esponja, que foi de 25% para todas as doses em igual período. Esta diferença é visível por observação directa dos gráficos de sobrevivências de cada um dos ensaios (Figuras 32 e 36).

No ensaio do encapsulamento verifica-se para as doses de 0.25g, 1g e 2g uma redução da sobrevivência com o aumento da dose de encapsulado. Este resultado é concordante com Calmasur *et al.* (2006), em que também se regista que o efeito do óleo essencial aumenta com o aumento da quantidade de produto e com a taxa de exposição. No entanto, as diferenças não são significativas entre as várias doses, sendo os valores de sobrevivência significativamente menores para a dose de 0.5g em comparação com as doses de 1g e 0.25g. Os dados obtidos com 0,5g de encapsulado são suspeitos. Este resultado poderá estar relacionado com o facto de as varroas já não se encontrarem no melhor estado, por terem sido capturadas no dia anterior à realização do ensaio e

mantidas em laboratório dentro de recipientes com zângãos, enquanto que nos outros tratamentos as varroas foram capturadas no mesmo dia em que foram feitos os ensaios.

A sobrevivência das varroas que ficaram nas caixas em branco foi significativamente superior, o que revela que a mortalidade da varroa nos diferentes tratamentos foi causada pelo encapsulado.

Pela observação dos gráficos dos ensaios do óleo essencial e do encapsulado é visível que a taxa de mortalidade da varroa, variou de 75% a mais de 95% ao fim de 2 horas, estes valores são semelhantes aos observados por outros investigadores com diferentes substâncias testadas em laboratório: óleo de orégãos (Gal *et al.* 1992; Kraus *et al.* 1994), óleo de citrina (Kraus *et al.*, 1994), óleo essencial de *Tagetes minuta* e *Heterotheca latifolia* e eucaliptol (Ruffinengo *et al.* 2007), ou o timol testado em colónias (Goodwin & Eatton, 1999). Estas taxas de mortalidade são superiores, no entanto, às verificadas por Neira *et al.* 2004, com óleos de *Lavandula officinalis* e *Laurelia sempervirens* em laboratório.

4. Conclusões

De uma forma geral os resultados deste trabalho mostram que a realização do tratamento contra a varroa em colónias que se encontram sem rainha pode trazer melhorias significativas na luta contra a varroa, ao nível da redução populacional do ácaro. Cerca de quatro semanas após a remoção da rainha já tinha morrido 90% da população de varroa que caiu durante todo o ensaio, no grupo que ficou sem rainha.

O ensaio deveria ser repetido numa outra época do ano, no final do Inverno início da Primavera, na altura em que as colónias estão a preparar a enxameação, de forma a perceber se o comportamento é semelhante e se o resultados se mantêm. De igual modo seria importante testar outro tipo de tratamento, para que caso tenham existido efeitos de resistência estes não voltassem a serem verificados.

Esta forma de luta biotécnica pode ser facilmente utilizada pelos apicultores com um número de colónias não muito alto (inferior a 50), na altura da enxameação, substituição de rainhas ou orfanizando as colónias; ou ainda por apicultores profissionais, na altura das substituições de rainhas no final da época de produção de mel. Nestas alturas há um período de ausência de cria nas colónias que pode ser utilizado com vantagem para tratar contra a varroa, com períodos de tratamento mais curtos e com bons resultados. É uma medida que pode ser utilizada em colónias em que a população do ácaro já atingiu um nível crítico.

A técnica tem algumas desvantagens: não é muito prática e exige muita disponibilidade de tempo por parte dos apicultores (Goodwin & Eatton, 1999). Portanto, o tratamento deve ser feito nas épocas do ano em que a colmeia fica sem rainha naturalmente para evitar grandes dispêndios de tempo e material, para se formar núcleos com rainhas ou adquirir rainhas novas já fecundadas. O método tem ainda como implicação uma diminuição da produtividade da colmeia (Imdorf *et al.* 2003) pelo que deve ser considerado numa análise de custos-benefícios.

No ensaio com o óleo essencial de *Mentha cervina* foi observado o efeito acaricida sobre a varroa, no entanto, este efeito é essencialmente causado por alguns compostos, provavelmente a isomentona e/ou pulegona, que se libertaram num intervalo de tempo de 30 a 60 minutos após a imersão na esponja. O aumento da quantidade de óleo

essencial aplicada nas esponjas não implicou um aumento da taxa de mortalidade, ao contrário do observado por (Calmasur *et al.* 2006). No entanto, o aumento da dose pode causar perturbações nas abelhas, podendo mesmo levar à morte destas, como se verificou com outros óleos essenciais (Ruffinengo *et al.* 2007), o que sugere que se pode dosear os compostos para uma dose baixa, de modo a manter o seu efeito acaricida sobre a varroa e reduzir o seu efeito sobre as abelhas.

Seria interessante repetir o ensaio da volatilização, nos mesmos moldes, no entanto, fazendo com que o tempo final de observação desde a colocação do óleo essencial, até a última observação realizada nessa caixa fosse igual para todas as caixas. Neste estudo não foi possível repetir os ensaios, porque as colmeias já tinham sido tratadas contra a varroa, não sendo, por isso, possível obter varroas em bom estado.

Duma forma geral os resultados obtidos com o óleo essencial de *Mentha cervina* foram interessantes, sugerindo uma aplicação potencial destes óleos no tratamento contra a varroa. Em particular o encapsulamento revelou excelentes resultados de mortalidade. Ainda são necessários mais estudos, a fim de saber como se comporta o óleo essencial na colmeia, em particular para saber como reagem as abelhas ao óleo essencial, qual a sua mortalidade, e se há alteração de comportamentos que sejam significativos por parte da colónia, tal como refere Neira *et al.* (2004).

Caso seja possível a sua aplicação na apicultura tem a vantagem de ser um composto natural, que não causa a contaminação dos produtos da colmeia (Felipe & Vandame, 1999), como o mel, a cera e o própolis, pois alguns destes compostos já estão presentes na constituição natural destes produtos (Murilhas & Casaca, 2010). E não traz problemas a nível ambiental, nem humano (Isman, 2000; Kéïta *et al.* 2000).

Um dos aspectos que pode ser uma mais valia na utilização do óleo essencial de *Mentha cervina* como acaricida contra a varroa é o facto do seu efeito se fazer sentir pouco tempo depois da sua aplicação. Por outro lado, levanta problemas com a sua conservação, pois terá de ser bem conservado até ao momento da sua aplicação, para não perder os compostos com efeito acaricida sobre a varroa. Para tal, terá de ser desenvolvido um sistema de fácil aplicação na colónia e que ao mesmo tempo conserve as propriedades e os compostos voláteis do óleo essencial. Outro aspecto importante a estudar é a influência da temperatura na sua volatilidade. No caso de produtos comerciais em que é utilizado o timol, o efeito da temperatura sobre a volatilidade pode comprometer a eficácia e segurança dos tratamentos (Goodwin & Eatton, 1999). O facto da constituição do óleo essencial poder variar com diversos factores ambientais, como a

disponibilidade de água, luz, agentes infecciosos, entre outros, quer por factores intrínsecos a própria planta como factores genéticos e bioquímicos (Regnault-Roger *et al.* 1993; Calderone & Spivak, 1995), também pode ter implicações na sua eficácia como foi verificado com outros compostos de origem vegetal usados no controlo da varroa (Mendes, 2004). Será ainda interessante estudar quais os constituintes do óleo essencial que têm efeito sobre a varroa e não mate as abelhas, isto é, deve-se usar apenas um único composto, vários compostos ou o conjunto de compostos em sinergia (o óleo essencial no todo), assim como estudar métodos adequados de encapsulamento que minimizem os riscos nas colmeias e aumentem a sua eficácia.

Posto isto, concluiu-se que embora o método seja muito promissor, ainda são necessários mais estudos e um melhor desenvolvimento da técnica de aplicação e conservação do produto até ao seu uso nas colmeias, caso seja possível a utilização deste óleo essencial de forma generalizada na apicultura com sucesso, todos ficariam a ganhar.

5.Referências bibliográficas

- Akyol, E.; Yeninar, H.; Karatepe, M.; Karatepe B.; Özkök, D.; 2007 - Effects of queen ages on Varroa (*Varroa destructor*) infestation level in Honey bee (*Apis mellifera caucasica*) colonies and colony performance; Italian Journal of Animal Science 6, 143-149
- Alves, F. 2009 - Perda global das populações de abelhas pode ser consequência da redução da diversidade de plantas
- Anderson, D.; Trueman, J.; 2000 - *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) s more than one species; Experimental and Applied Acarology 24; 165-189
- Ariana, A.; Ebadi, R.; Tahmasebi, G.; 2002 - Laboratory evaluation of some plant essences to control Varroa destructor (Acari :Varroidae); Experimental and Applied Acarology 27; 319-327
- Bademacher, F.; Imdorf, A.; 2004 - Legalization of the use of oxalic acid in varroa control Bee World; Vol.85, 70-72
- Bakkali, f.; Averbeck, S.; Averbeck, D.; Idaomar, M.; 2008 - Biological effects of essencial oils – A review; Food and Chemical Toxicology 46; 446-475
- Banchio, E.; Zygadlo, J.; Valladares, G.; 2005 - Quantitative variations in the Essentials oil of *Minthostachys mollis* (Kunth.) Griseb. in response to insects with different feeding habits; Journal agricultura and food chemistry, 53; 6903-6906
- Barros, F.; Stringheta, P.; 2010(data de consulta) - Microencapsulamento de antocianinas; Biotecnologia ciência e desenvolvimento
- Belchior, S.; 2009 - *Mentha cervina L.* Insectos e fungos associados Propriedades insecticidas do óleo essencial; Dissertação para a obtenção do grau de Mestre a Engenharia Agronómica; Lisboa
- Beristain, C.; García, H.; Vermon-Carter.; 2001 - Spray-dried Encapsulation of cardamom (*Elettaria cardamomum*) Essential oil with mesquite (*Prosopis juliflora*) Gum; Lebensm. Wiss. u. Technol. 34; 398-401
- Betts, T.; 2001 - Chemical characterisation of the different types of volatile oil constituents by various solute retention ratios with the use of conventional and novel commercial gas chromatographic stationary phases; Journal of Chromatography A 936; 33-46

- Bogdanov, S.; Charrière, J.; Imdorf, A.; Kilchenmann, V.; Fluri, P.; 2002 - Determination of residues in honey after treatments with formic and oxalic acid under field conditions; *Apidologie* 33: 399-409
- Bogdanov, S.; Imdorf, A.; Kilchenmann, V.; 1998 - Residues in wax and honey after Apilife VAR[®] treatment; *Apidologie*, Vol. 29; 513-524
- Branco, M.; Kidd, N.; Pickald, R.; 2006 - Comparative evaluation of Sampling methods for *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) population estimation; *Apidologie* 37; 452-461
- Brattsten, L.; 1983 - Cytochrome P-450 Involvement in the Interactions Between Plant Terpenes and Insect Herbivores; *Plant Resistance to insects*, Chapter 10; 173-195
- Calderone, N.; 2005 - Evaluation of Drone Brood Removal for Management of *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) in Colonies of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) in the Northeastern United States; *Journal of Economic Entomology* 98: 645-650.
- Calderone, N.W., Spivak, M.; 1995 - Plant extracts for control of the parasitic mite *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) in colonies of the western honey bee (Hymenoptera: Apidae). *J. Econ. Entomol.* 88(5): 1211-1215.
- Calmasur, O.; Aslan, I.; Sahin, F.; 2006 - Insecticidal and acaricidal effect of three Lamiaceae plant essential oils against *Tetranychus urticae* Koch and *Bemisia tabaci* Genn.; *Industrial Crops and Products* 23; 140–146
- Campiche, S.; Slooten K.; Ridreau, C.; Tarradellas, J.; 2006 - Effects of insect growth regulators on the nontarget soil arthropod *Folsomia candida* (Collembola); *Ecotoxicology and Environmental Safety* 63; 216-225
- Campos, L.; Mourato, M.; 2002 *Nomenclatura dos compostos orgânicos*; Escola Editora; 54-88
- Charrière, J.; Imdorf, A.; 2002 - Oxalic acid treatment by trickling against *Varroa destructor*: Recommendations for use in central Europe and under temperate climate conditions; *Bee World*, 83; 51-60
- Elzen, P.; Eischen, F.; Baxter, J.; Elzen, G.; Wilson, W.; 1999 - Detection of resistance in US *Varroa jacobsoni* Oud. (Mesostigmata: Varroidae) to the acaricide fluvalinate; *Apidologie*, 30; 13-17
- Emsen, B.; Dodologlu, A.; 2009 - The effects of using different organic compounds against honey bee mite (*Varroa destructor* Anderson and Trueman) on colony developments of honey bee (*Apis mellifera* L.) and residue levels in honey; *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 8 ; 1004-1009

- Felipe, M.; Vandame, R.; 1999 – Curso de capacitación sobre control alternative de varroa en la apicultura (16/3/2010)
- Flores, J.; Ruíz, J.; Ruz, J.; Puerta, F.; Campano, F.; 1999 – Control de Varroasis: Investigación sobre tratamientos alternativos el sur de España
- Fnap; <http://www.fnep.pt/noticias.php?id=61> 2/2/2010 12:40
- Francisco, L.; 1990 - Eficácia de alguns métodos naturais de rastreio de varroose; II Congresso Florestal Nacional; Porto, 665-676
- Franco, J.; 1984 - Nova Flora de Portugal (Continente e Açores). Volume II. Lisboa.
- Fuchs, S.; Langenbach, K.; 1989 - Multiple infestation of *Apis mellifera* L. brood and reproduction in *Varroa jacobsoni* Oud.; *Apidologie* 20; 257-266.
- Gal, H.; Slabezki, Y.; Lensky Y.; 1992 - A preliminary report on the effect of oil and thymol applications in honeybee colonies in a subtropical climate on population levels of U.S. *Bee Science* 2: 175–180
- Gershenson, J.; Dudareva N.; 2007 - The function of terpene natural products in the natural world; *Nature Chemical Biology* 3; 408-414
- Gershenson, J.; McConkey, M.; Coteau R.; 2000 - Regulation of Monoterpene Accumulation in leaves of Peppermint; *Plant Physiology*, 12; 205-213
- Goodwin, M.; Eatton, C.; 1999 – Controlo the Varroa A guide for New Zealand Beekeepers.
- Gregorc, A.; Skerl, M.; 2007 - Combating *Varroa destructor* in honeybee colonies using flumethrin of fluvalinate. *Acta veterinaria Brno*, 76: 309-314.
- Grundy, D.; Still, C.; 1985 - Inhibition of actetylcholinesterases by pulegone-1,2-epoxide; *Pesticide biochemistry and physiology*, 23; 383-388
- Gunderson, A.; Samuelian, H.; Evans, K.; Brasttsten, B.; 1985 - Effects of the mint Monoterpene Pulegone on *Spodoptera eridania* (Lepidoptera: noctuidae); *Environmental Entomology* 14; 859-863
- Gunderson, C.; Brattsten, L.; Fleming, J.; 1985 - Microsomal oxidase and glutathione transferase as factors influencing the effects of pulegone in southern and fall armyworm larvae; *Pesticide Biochemistry and Physiology* 26, 238-249
- Harwood, S.; Moldenke, A.; Berry, R.; 1990 - Toxicity of Peppermint Monoterpenes to the Variegated Cutworm (Lepidoptera: Noctuidae); *Journal of Economic Entomology* 83; 1761-1767

- Hendrikx, P.; Chauzat, M.; Debin, M.; Fries, I.; Ritter, W.; Brown, M.; Mutinelli, F.; Le Cote, Y.; Gregorc, A. ; 2009 - Bee Mortality and Bee Surveillance in Europe; Scientific Report submitted to EFSA.
- Higes, M.; Meana, A.; Suárez, M.; Llorente, J.; 1999 - Negative long-term effects on bee colonies treated with oxalic acid against *Varroa jacobsoni* Oud.; *Apidologie*; 30: 289-292
- Hooper, T., 1976 – Guia do Apicultor; editora Publicações Europa-America LDA, Portugal, 194-217
- Hoyo, M.; Cabrera, C.; 2004 - Varroa, un problema con solución;
- Ikemoto, Y.; Matsuzawa Y.; Mizutani, J.; 2002 - The effect of antiteedants agains the level of biogenic amines in fhe central nervous system of the Lepidopteran insect (*Spodoptera litura*); *pesticide Biochemistry and Physiology*, 52; 60-70
- Indorf, A.; Charrière, J.; Kilchenmann, V.; Bogdanov, S.; Fluri, P.; 2003 - Alternative Srtategy in central Europe for the control of *Varroa destructor* in honey bee colonies; *Apiacta* 38; 258-285
- Ismail, A.; Ghoniemy, H.; Owayss A.; 2006 - Combatting Honeybee Varroa mites by plant oils Alone or INANIPM program; The 2nd conference of farm integrated pest management; 172-185
- Isman, M.; 2000 - Plant essential oils for pest and disease management; *Crop Protection* 19 (2000) 603-608
- Jean-Prost, P. 1995 – Apicultura; 3º Edición Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, 38-39 e 227-336
- Kanga, L.; James, R.; Boucias D.; 2002 - *Hirsutella thompsonii* and *Metarhizium anisopliae* as potential microbial Control agents of *Varroa destructor*, a honey bee parasite; *Journal of Invertebrate Pathology* 81; 175-184
- Kéïta, S. ; Vincent, C. ; Schmit, J. ; Ramaswamy, S.; Bêlanger, A.; 2000 - Efect of various essential oils on *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae); *Journal of Stored Products Research* 36; 355- 364
- Kostyukovsky, M.; Rafaeli, A.; Gileadi, C.; Demchenko N.; Shaaya, E.; 2002 - Activation of octopaminergic receptors by essential oil constituents isolated from aromatic plants: possible mode of action against insect pests; *Pest Management Science*, 1101-1106

- Kraus, C.; Koeniger N.; Fuchs S.; 1994 - Screening of substances for their effect on *Varroa jacobsoni*: attractiveness, repellency, toxicity and masking effects of ethereal oils. J. Apic.33: 34-42
- Kuenen, L.; Calderone, N.; 1999 - Varroa mite infestations in elevated homey bee brood cells: effects of context and caste; Jornal of Insect Behavior, 13;
- Llorente, J.; Suárez, M.; Higes, M.; 1994 - Control de varroosis con la cría de Zánganos dirigida; I congreso de la sociedad Española de agricultura Ecológica, Toledo
- Lobb, N.; Martin, S.; 1997 - Mortality of *Varroa jacobsoni* Oudemans during or soon after the emergence of Worker and drone honeybees *Apis mellifera* L.; Apidologie 28, 367-374
- Lodesani, M.; 2004 - Control strategies of varroa mites, Parassitologia; 46; 277-279
- Lodesani, M.; Colombo, M.; Spreafico, M.; 1995 - Ineffectiveness of Apistan® treatment against the mite *Varroa jacobsoni* Oud in several districts of Lombardy (Italy); Apidologie; 26; 67-72
- Lodesani, M.; Costa, C.; Serra, G.; Colombo, R.; Sabatini, G.; 2007 - Acaricide residues in beeswax after conversion to organic beekeeping methods; Apidologie; 39: 324-333
- Madeira, J., 2008 - Estudo comparativo dos fluxos polínicos anemófilos e entomófilos (*Apis mellifera* spp) e respectivo contributo na produtividade agrícola e qualidade dos produtos da colmeia; Faculdade de ciências Universidade do Porto; Porto; 2
- Maggia, M., Ruffinengo, S.; Gende L.; 2010 - Laboratory Evaluations of *Syzygium aromaticum* L. Merr. Et Perry essential oil against *Varroa destructor*; The Journal of Essencial Oil Research 22; 119-122
- Martin, S.; 1998 - A population model for the ectoparasitic mite *Varroa jacobsoni* in honey bee (*Apis mellifera*) colonies; Ecological Modelling 109; 267-281
- Martin, C.; Salvy, M.; Provost, E.; Bagnères, A.; Roux, M.; Crauser, D.; Clement, J. ; Le Conte, Y. ; 2001 - Varitions in chemical mimicry by the ectoparasitic mite *Varroa jacobsoni* according to developmental stage of the host honey-bee *Apis mellifera*; Insect Biochemistry and Molecular Biology 31; 365-379
- Martinho, M., 1988 - A criação de abelhas, 2ª edição, Publicações Globo, São Paulo pp 162-177
- McConkey, M.; Gershenzon, J.; Coteau R.; 2000 - Developmental Regulation of Monoterpene Biosynthesis in the Glandular Trichomas of Peppermint; Plant Physiology 122; 215-223

- Mendes, V.; 2004 - Estudo da acção do própolis na sanidade Apícola, Relatório do trabalho de Fim de curso de Engenharia Agronómica; Lisboa, pp 3-28
- Milani, N.; 1999 - The resistance of *Varroa jacobsoni* Oud. to acaricides; *Apidologie*; 30; 229-234
- Milani, N.; Vedova, G.; 1996 - Determination of the LC₅₀ in the mite *Varroa jacobsoni* of the active substances in Perizin® and Cekafix®; *Apidologie*; Vol.3; N°3; pp 175-184
- Monteiro, A.; Póvoa, O.; Marinho, S.; Rodrigues, L.; Monteiro, P.; 2008 - *Mentha pulegium e Mentha cervina* - Os Poejos na boa Cozinha Portuguesa. ISA Press, Lisboa.
- Murilhas, A. 2007 - Apicultura e polinização; *Revista O Apicultor*; Ano 17, N° 62, Out./Dez. 08, 7-10
- Murilhas, A.; Casaca, J.; (data de consulta 2010) - Utilização do TIMOL na Luta Contra a Varroa em Portugal; Programa AGRO; Desenvolvimento Experimental Natural world; *Nature Chemical Biology* 3; 408-414
- Neira, M.; Heinsohn, P.; Carrillo, R.; Báez A.; Fuentealba, J.; 2004 - The Effect of Lavender and Laurel Essential Oils on *Varroa destructor* Anderson & Truemann (Acari:Varroidae); *Agric. Téc. Chillán*, 64 ;
- Omholt, S.; Lonvik, K.; 1986 - Heat production in the winter cluster of the honeybee, *Apis mellifera*. A theoretical study; *Journal of Theoretical Biology* 120; 447-456
- Phillips, T.; Parajulee, M.; Weaver, D.; 1995 - Toxicity of terpenos Secreted by the predator *Xylocoris flavipes* (Reuter) to *Tribolium castaneum* (Herbst) and *Oryzaephilus surinamensis* (L.); 131-138
- Programa Apícola Nacional, 2007 - Programa Apícola Nacional; *Revista O Apicultor*; 14; 17-30
- Regnault-Roger, C.; Hamraoui, A.; Holeman, M.; Theron, E.; Pinel, R.; 1993 - Insecticidal Effect of essential oils from mediterranean plants upon *Acanthoscelides Obtecus* Say (Coleóptera, Bruchidae), a pest of Kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.); *Journal of Chemical Ecology*, 19;
- Rosenkranz, P.; Aumeier, P.; Ziegelmann, B.; 2009 - Biology and controlo of *Varroa destructor*; *Journal of invertebrate Pathology*
- Ruffinengo, S.; Maggi, M.; Faverin, C.; García de la Rosa S.; Bailac P.; Principal J.; Eguaras, M.; 2007 - Essential oils toxicity related to *Varroa destructor* and *Apis mellifera* under laboratory conditions; *Zootecnia Trop.*, 25;

- Sammataro, D.; Untalan, P.; Guerrero, F.; Finley, J.; 2005 - The resistance of varroa mites (Acari: Varroidae) to acaricides and the presence of esterase; International Journal of Acarology 31; 67 - 74
- Sangwan, N.; 2001 - Regulation of essential oil production in plants; Plant Growth Regulation 34; 3-21
- Serrano, J.; Pires, S.; Puerta, F.; 2001 - Comportamento higiénico de *Apis mellifera* Ibérica em células de criação de obreira artificialmente infestadas com o parasita varroa; Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias XCVI; 71-74
- Shaw, K.; Davidson, G.; Clark, S.; Ball, B.; Pell, J.; Chandler, D.; Sunderland, K.; 2002 - Laboratory bioassays to assess the pathogenicity of mitosporic fungi to *Varroa destructor* (Acari: Mesostigmata), an ectoparasitic mite of the honeybee, *Apis mellifera*; Biological Control; 24; 266-276
- Southwick, E.; 1982 - The honey bee cluster as a homeothermic superorganism; Comparative biochemistry and physiology Part A: Physiology 75; 641-645
- Stabentheiner, A.; Pressl, H.; Paspt, T.; Hrassnigg, N.; Crailshein K.; 2003 - Endothermic heat production in honeybee winter clusters; The journal of Experimental Biology 206; 353-358
- Sumpter, D.; Broomhead, S.; 2000 - Shape and dynamics of thermoregulating honey bee clusters; Journal of Theoretical Biology 24; 1-14
- Teixeira, C.; 1988 - A Varroose no mundo e em Portugal; I Congresso Florestal Nacional, Lisboa; 367-373
- Valduga, E.; Prado, R.; Padilha, F.; Treichel H.; 2007 - Extraction, spray drying and microencapsulating of “Isabel” grape (*Vitis labrusca*) bagasse anthocyanin
- Vieira, G., Branco, M., 1992 - Evolução das populações do *Varroa jacobsoni* Ound em colónias de abelhas sujeitas a tratamento químico; Actas V Congresso Ibérico de Entomologia, Lisboa, II; 251-257
- Viegas, M.; Bassoli, D.; 2007 - Utilização do índice de retenção linear para caracterização de compostos voláteis em café solúvel utilizando GC-MS e coluna HP-Innowax; Química Nova; 30
- Wilkinson, D.; Smith, G.; 2002 - A model of the mite parasite, *Varroa destructor*, on honeybees (*Apis mellifera*) to investigate parameters important to mite population growth; Ecological Modelling; 148, 263-275

6.Anexos

6.1.Anexo 1

Anexo 1.1: Dados referentes à contagem da queda de varroa durante todo o ensaio.

Período /Colmeia		Contagens															
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
30-09-2009	07-10-2009	96	80	144	55	36	20	50	63	143	81	72	112	25	196	75	37
07-10-2009	12-10-2009	105	211	738	468	201	164	40	226	468	378	392	364	34	64	339	309
12-10-2009	13-10-2009	17	23	133	36	185	164	18	63	34	84	104	99	34	64	62	77
13-10-2009	14-10-2009	122	43	283	74	271	60	21	104	85	69	121	139	49	122	260	81
14-10-2009	15-10-2009	121	95	289	92	295	46	21	106	119	85	179	179	74	206	275	81
15-10-2009	17-10-2009	183	123	531	238	411	74	212	159	509	209	255	286	62	396	537	285
17-10-2009	19-10-2009	206	242	401	342	239	121	133	211	448	198	218	342	114	541	416	412
19-10-2009	20-10-2009	114	135	44	134	75	77	134	156	259	188	169	262	147	261	303	264
20-10-2009	21-10-2009	106	146	345	104	83	52	118	168	146	112	136	238	52	235	230	226
21-10-2009	23-10-2009	203	298	615	206	108	95	154	194	346	165	221	222	173	454	291	313
23-10-2009	27-10-2009	694	649	1818	850	137	490	383	519	1339	1168	686	848	530	1334	537	742
27-10-2009	28-10-2009	86	182	261	102	27	97	92	131	128	228	136	179	229	427	70	289
28-10-2009	31-10-2009	428	274	944	503	107	237	298	136	559	737	351	481	528	710	106	835
31-10-2009	02-11-2009	255	74	252	218	97	164	144	131	437	420	162	211	196	472	35	516
02-11-2009	04-11-2009	288	46	313	230	111	125	68	379	436	307	199	205	168	465	34	330
04-11-2009	09-11-2009	268	201	378	475	164	66	169	218	654	603	332	154	364	481	44	184
09-11-2009	11-11-2009	135	235	33	146	88	17	41	132	317	42	159	17	83	115	83	63
11-11-2009	14-11-2009	168	303	38	205	94	18	58	78	368	155	128	23	76	109	15	38
14-11-2009	16-11-2009	119	53	22	134	58	6	92	20	256	55	103	8	19	47	8	23
16-11-2009	18-11-2009	135	75	36	168	43	2	100	20	191	53	110	4	19	53	38	51
18-11-2009	23-11-2009	555	292	93	353	72	8	421	66	528	66	432	12	88	82	156	67
23-11-2009	25-11-2009	178	119	16	189	49	7	78	60	98	7	90	7	26	46	23	21
25-11-2009	02-12-2009	354	69	47	478	89	65	447	63	228	45	421	5	67	250	68	47
02-12-2009	09-12-2009	276	62	18	398	16	6	300	100	26	16	191	10	24	115	67	7
09-12-2009	14-12-2009	254	19	15	6	11	6	163	80	21	32	210	0	5	331	30	3

Anexo 1.2: Distribuição das colmeias nas duas modalidades.

	Com rainha	Sem rainha
Número das colmeias	1	3
	2	5
	4	6
	7	10
	8	12
	9	13
	11	14
	16	15

As colmeias foram distribuídas pelas duas modalidades, para que nos dois grupos houve-se uma representação semelhante das populações de varroas.

Anexo 1.3: Dados das contagens da queda de varroa, acumulados ao longo do ensaio.

	Número da colmeia															
Contagem	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1	22	80	144	55	36	20	50	63	143	81	72	112	25	196	75	37
2	39	291	882	523	237	184	90	289	611	459	464	476	59	260	414	346
3	56	314	1015	559	422	348	108	352	645	543	568	575	93	324	476	423
4	178	357	1298	633	693	408	129	456	730	612	689	714	142	446	736	504
5	299	452	1587	725	988	454	150	562	849	697	868	893	216	652	1011	585
6	482	575	2118	963	1399	528	362	721	1358	906	1123	1179	278	1048	1548	870
7	688	817	2519	1305	1638	649	495	932	1806	1104	1341	1521	392	1589	1964	1282
8	802	952	2563	1439	1713	726	629	1088	2065	1292	1510	1783	539	1850	2267	1546
9	908	1098	2908	1543	1796	778	747	1256	2211	1404	1646	2021	591	2085	2497	1772
10	1111	1396	3523	1749	1904	873	901	1450	2557	1569	1867	2243	764	2539	2788	2085
11	1805	2045	5341	2599	2041	1363	1284	1969	3896	2737	2553	3091	1294	3873	3325	2827
12	1891	2227	5602	2701	2068	1460	1376	2100	4024	2965	2689	3270	1523	4300	3395	3116
13	2319	2501	6546	3204	2175	1697	1674	2236	4583	3702	3040	3751	2051	5010	3501	3951
14	2574	2575	6798	3422	2272	1861	1818	2367	5020	4122	3202	3962	2247	5482	3536	4467
15	2862	2621	7111	3652	2383	1986	1886	2746	5456	4429	3401	4167	2415	5947	3570	4797
16	3130	2822	7489	4127	2547	2052	2055	2964	6110	5032	3733	4321	2779	6428	3614	4981
17	3265	3057	7522	4273	2635	2069	2096	3096	6427	5074	3892	4338	2862	6543	3697	5044
18	3433	3360	7560	4478	2729	2087	2154	3174	6795	5229	4020	4361	2938	6652	3712	5082
19	3552	3413	7582	4612	2787	2093	2246	3194	7051	5284	4123	4369	2957	6699	3720	5105
20	3687	3488	7618	4780	2830	2095	2346	3214	7242	5337	4233	4373	2976	6752	3758	5156
21	4242	3780	7711	5133	2902	2103	2767	3280	7770	5403	4665	4385	3064	6834	3914	5223
22	4420	3899	7727	5322	2951	2110	2845	3340	7868	5410	4755	4392	3090	6880	3937	5244
23	4774	3968	7774	5800	3040	2175	3292	3403	8096	5455	5176	4397	3157	7130	4005	5291
24	5050	4030	7792	6198	3056	2181	3592	3503	8122	5471	5367	4407	3181	7245	4072	5298
25	5304	4049	7807	6204	3067	2187	3755	3583	8143	5503	5577	4407	3186	7576	4102	5301

Anexo 1.4: Total de queda e total da População de varroa por colmeia.

	Número da colmeia															
Nº colmeia	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Total Queda	5304	4049	7807	6204	3067	2187	3755	3583	8143	5503	5577	4407	3186	7576	4102	5301
1%	53	40	78	62	31	22	38	36	81	55	56	44	32	76	41	53
Total População	5357	4089	7885	6266	3098	2209	3793	3619	8224	5558	5633	4451	3218	7652	4143	5354

Anexo 1.5: Dados meteorológicos com maior interesse para o ensaio, no período referente à realização.

Data de início	Data de fim	Temp. média (°C)	Temp. max (°C)	Prec. (mm)	Insolação (h)
30-09-2009	07-10-2009	21,6	25,6	10,9	5,9
07-10-2009	12-10-2009	22,1	27,1	8,8	9,0
12-10-2009	13-10-2009	26,5	31,6	0,0	10,1
13-10-2009	14-10-2009	25,2	29,6	0,0	10,0
14-10-2009	15-10-2009	22,8	28,3	0,0	10,0
15-10-2009	17-10-2009	21,7	27,2	0,0	9,8
17-10-2009	19-10-2009	18,6	23,8	0,0	8,4
19-10-2009	20-10-2009	17,6	21,3	0,0	6,1
20-10-2009	21-10-2009	17,3	20,2	1,4	2,9
21-10-2009	23-10-2009	17,4	21,1	20,6	3,2
23-10-2009	27-10-2009	19,3	24,2	0,0	4,7
27-10-2009	28-10-2009	21,4	26,5	0,0	5,2
28-10-2009	31-10-2009	20,0	23,9	0,0	6,4
31-10-2009	02-11-2009	19,0	23,0	6,2	5,6
02-11-2009	04-11-2009	17,4	20,9	8,0	5,2
04-11-2009	09-11-2009	16,6	19,6	4,8	5,3
09-11-2009	11-11-2009	17,2	20,1	1,3	5,6
11-11-2009	14-11-2009	17,3	21,1	2,0	3,4
14-11-2009	16-11-2009	18,7	21,9	27,7	1,6
16-11-2009	18-11-2009	16,1	18,9	30,0	3,4
18-11-2009	23-11-2009	15,4	18,8	9,6	3,4
23-11-2009	25-11-2009	13,8	17,6	0,3	5,2
25-11-2009	02-12-2009	14,1	17,6	41,2	2,4
02-12-2009	09-12-2009	14,7	16,9	30,9	2,1
09-12-2009	14-12-2009	12,8	15,7	3,0	5,0

Anexo 1.6: Resultados obtidos no programa R.

Anexo 1.6.1: Resultados do modelo hierarquizado.

Dados do modelo hierarquizado					
	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
rainha	1	14612	14612	127.828	0.0004 ***
rainha:colmeia	2	669	335	0.2928	0.74633
Residuals	346	395507	1143		

Anexo 1.6.2: Médias do ensaio.

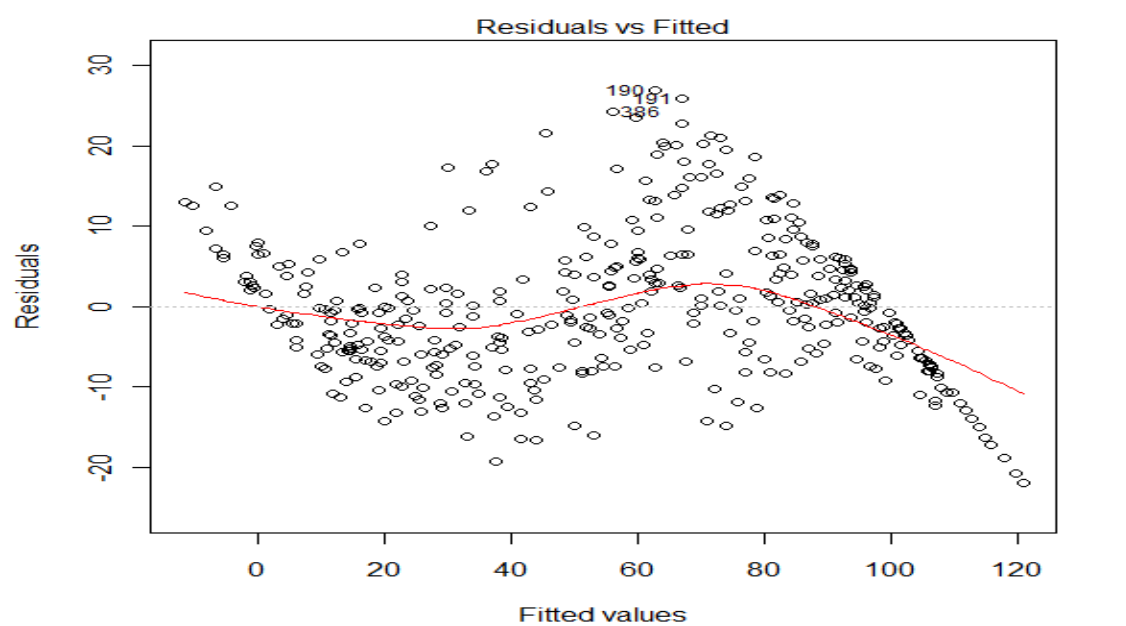
Tabela com as médias		
média geral	0.575	
rainha	com	sem
médias	0.518	0.632
repetições	200	200

Anexo 1.6.3: Dados do modelo completo.

Modelo completo				
	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	-2,32E+04	6,54E+04	-3.543	0.0004***
rainhasem	8,90E+03	9,18E+02	9.693	< 2e-16 ***
insolacao	-1,45E+03	3,37E+02	-4.313	2.04e-05 ***
tempmedia	1,71E+03	9,25E+02	1.853	0.0646 .
tempmax	-3,25E+02	8,23E+02	-0.395	0.6933
precipitacao	-2,53E+02	4,93E+01	-5.126	4.68e-07 ***
areaposturainicio	-4,64E+00	7,11E-01	-6.525	2.11e-10 ***
areaposturafinal	-2,61E+00	6,46E-01	-4.041	6.41e-05 ***
estimativapop	1,86E+00	2,59E-01	7.179	3.58e-12 ***
numerocontagem	4,85E+03	1,26E+02	38.420	< 2e-16 ***
R	F_Staitistic	DF	DF	P
0.93	619.3	9	390	< 2.2e-16

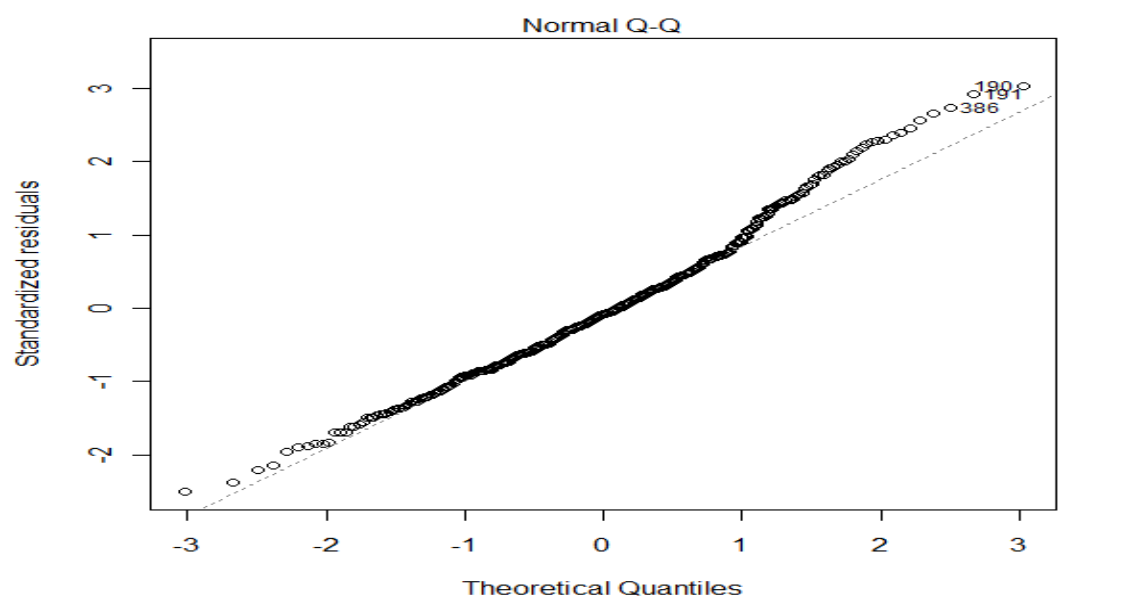
Anexo 1.6.4: Dados do modelo simples.

Modelo simples				
	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	-2,38E+04	6,32E+03	-3.773	0.0001 ***
rainhasem	8,90E+03	9,17E+02	9.703	< 2e-16 ***
insolacao	-1,50E+03	3,13E+02	-4.794	2.33e-06 ***
tempmedia	1,37E+03	2,76E+02	4.949	1.11e-06 ***
precipitacao	-2,51E+02	4,91E+01	-5.116	4.90e-07 ***
areaposturainicio	-4,64E+00	7,10E-01	-6.532	2.02e-10 ***
areaposturafinal	-2,61E+00	6,45E-01	-4.046	6.29e-05 ***
estimativapop	1,86E+00	5,84E-02	7.187	3.39e-12 ***
numerocontagem	4,86E+03	1,25E+02	38.825	< 2e-16 ***
R	F_Staitistic	DF	DF	P
0.93	698.2	8	391	< 2.2e-16



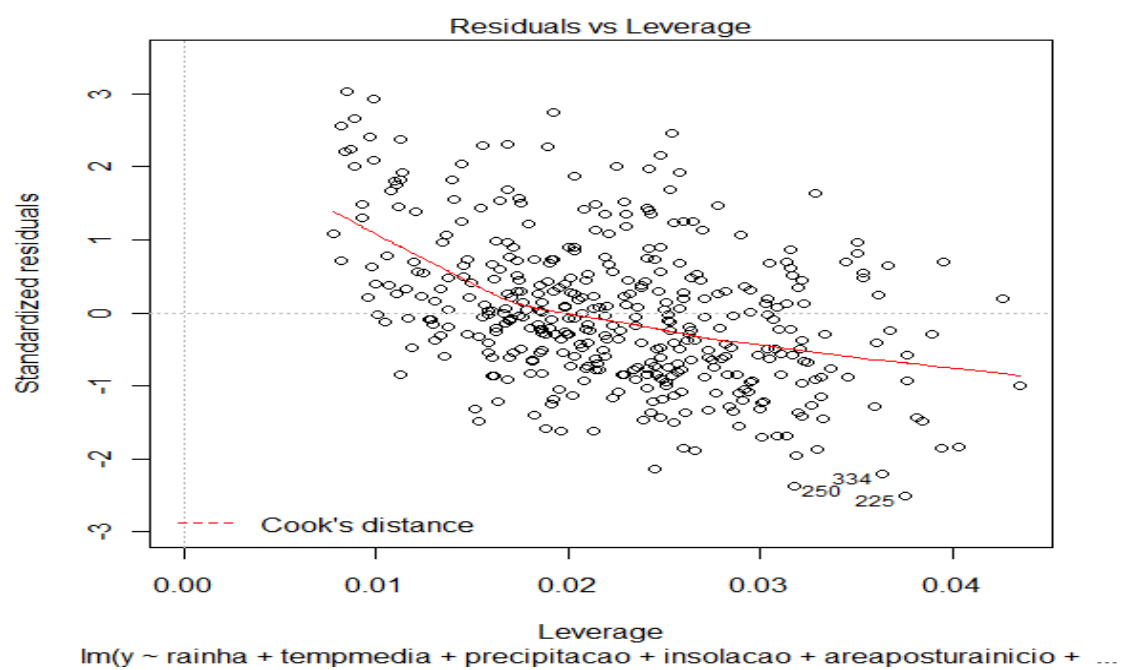
lm(y ~ rainha + tempmedia + precipitacao + insolacao + areaposturainicio + ...

Anexo 1.6.5: Gráfico dos Resíduos vs valores Estimados.



lm(y ~ rainha + tempmedia + precipitacao + insolacao + areaposturainicio + ...

Anexo 1.6.6: Gráfico da Normalidade dos resíduos.



Anexo 1.6.7: Gráfico dos resíduos estandardizados e distâncias de Cook's.

6.2. Anexo II

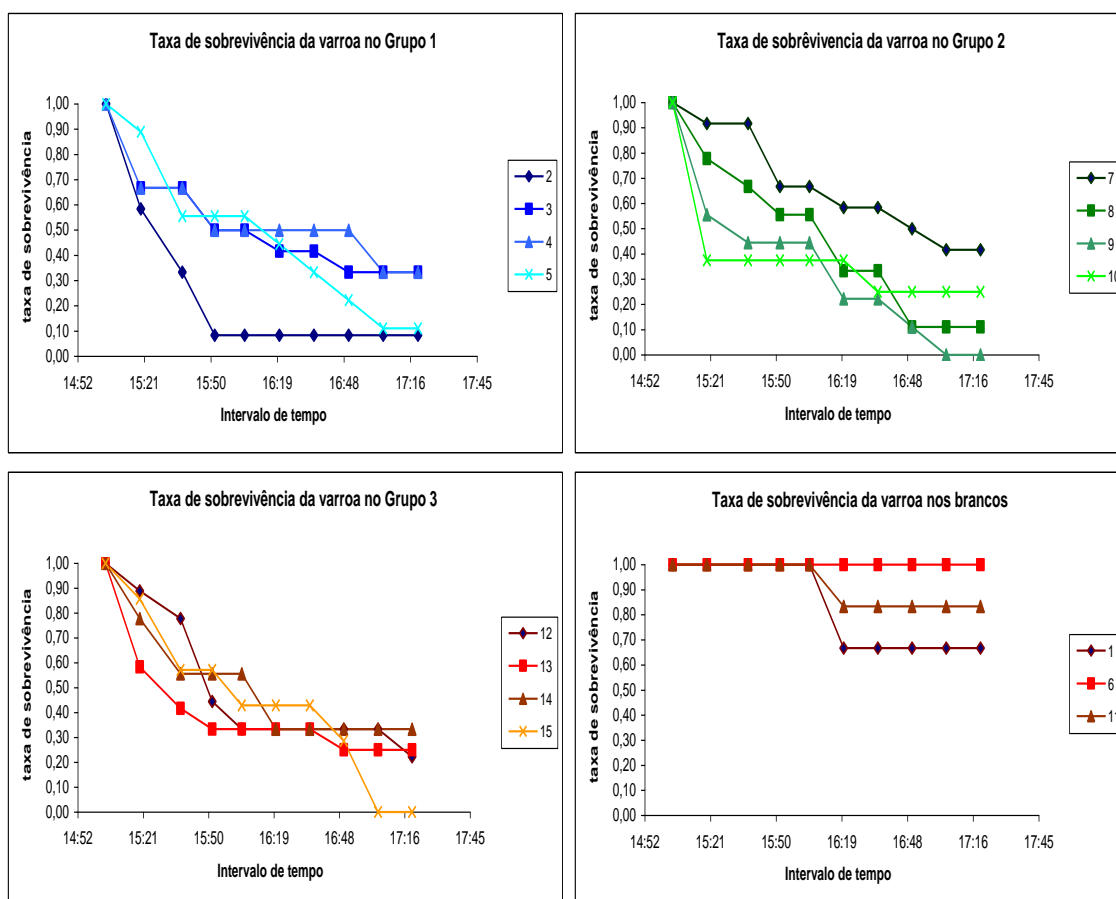
Parte 2: Ensaios com óleo essencial de *Mentha cervina*

Anexo 2.1: Dados do ensaio com o óleo essencial de *Mentha cervina*, número de varroas mortas ao longo do tempo

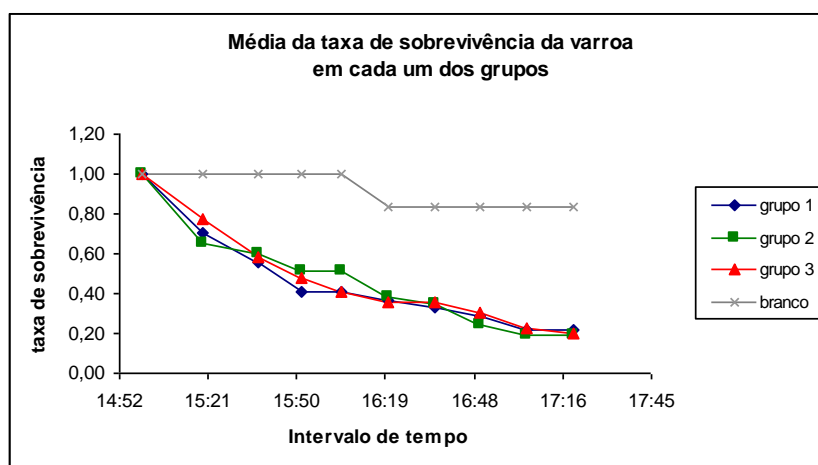
	Hora	15:05	15:20	15:38	15:52	16:05	16:20	16:35	16:50	17:05	17:20	
	Tempo minutos	0	15	33	47	60	75	90	105	120	135	
Grupos	nº da caixa	0º	1º	2º	3º	4º	5º	6º	7º	8º	9º	Total varroas
1	2	0	5	8	11	11	11	11	11	11	11	12
5 µl	3	0	4	4	6	6	7	7	8	8	8	12
	4	0	4	4	6	6	6	6	6	8	8	12
	5	0	1	4	4	4	5	6	7	8	8	9
	7	0	1	1	4	4	5	5	6	7	7	12
7,5 µl	8	0	2	3	4	4	6	6	8	8	8	9
	9	0	4	5	5	5	7	7	8	9	9	9
	10	0	5	5	5	5	5	6	6	6	6	8
3	12	0	1	2	5	6	6	6	6	6	7	9
10 µl	13	0	5	7	8	8	8	8	9	9	9	12
	14	0	2	4	4	4	6	6	6	6	6	9
	15	0	1	3	3	4	4	4	5	7	7	7
Branco	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	3
	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5
	11	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	6

Anexo 2.2: Taxa de sobrevivência do ensaio com o óleo essencial de *Mentha cervina*.

Grupos	nº da caixa	15:05	15:20	15:38	15:52	16:05	16:20	16:35	16:50	17:05	17:20
1	2	1,00	0,58	0,33	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08
5 µl	3	1,00	0,67	0,67	0,50	0,50	0,42	0,42	0,33	0,33	0,33
	4	1,00	0,67	0,67	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,33	0,33
	5	1,00	0,89	0,56	0,56	0,56	0,44	0,33	0,22	0,11	0,11
	7	1,00	0,92	0,92	0,67	0,67	0,58	0,58	0,50	0,42	0,42
7,5 µl	8	1,00	0,78	0,67	0,56	0,56	0,33	0,33	0,11	0,11	0,11
	9	1,00	0,56	0,44	0,44	0,44	0,22	0,22	0,11	0,00	0,00
	10	1,00	0,38	0,38	0,38	0,38	0,38	0,25	0,25	0,25	0,25
3	12	1,00	0,89	0,78	0,44	0,33	0,33	0,33	0,33	0,33	0,22
10 µl	13	1,00	0,58	0,42	0,33	0,33	0,33	0,33	0,25	0,25	0,25
	14	1,00	0,78	0,56	0,56	0,56	0,33	0,33	0,33	0,33	0,33
	15	1,00	0,86	0,57	0,57	0,43	0,43	0,43	0,29	0,00	0,00
Branco	1	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,67	0,67	0,67	0,67	0,67
	6	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
	11	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,83	0,83	0,83	0,83	0,83



Anexo 2.3: Taxas de sobrevivência no ensaio com o óleo essencial, nos diferentes grupos.



Anexo 2.4: Taxa média de sobrevivência da varroa nos grupos do ensaio com o óleo essencial.

Anexo 2.5: As médias e medianas para a sobrevivência da varroa no tempo em cada tratamento

Means and Medians for Survival Time

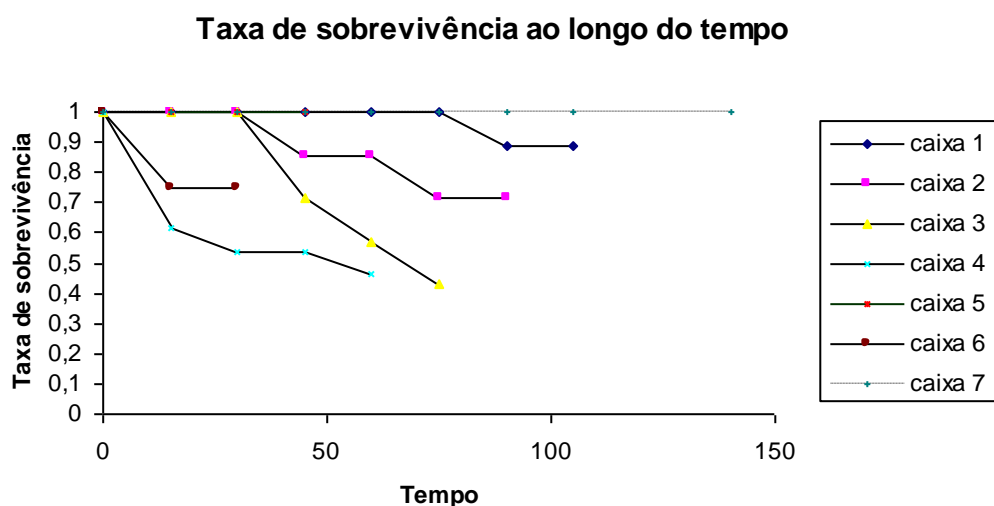
Tratamento	Meana				Median			
	Estimate	Std. Error	95% Confidence Interval		Estimate	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound			Lower Bound	Upper Bound
,00	126,429	5,611	115,430	137,427
1,00	63,261	7,408	48,740	77,781	45,000	7,639	30,028	59,972
2,00	68,108	7,874	52,676	83,540	75,000	14,750	46,090	103,910
3,00	66,486	8,075	50,659	82,314	45,000	15,157	15,293	74,707
Overall	72,090	4,354	63,556	80,623	60,000	9,301	41,770	78,230

Anexo 2.6: Resultados do ensaio de volatilização.

Horas	11:45	12:00	12:15	12:30	12:45	13:00	13:15	13:30	15:51	5µl
Tempo Minutos	0	15	30	45	60	75	90	105	226	
Caixas	Observação	1	2	3	4	5	6	7		Total
1	0	0	0	0	0	0	1	1		9
2		0	0	0	1	1	2	2		7
3			0	0	0	2	3	4		7
4				0	5	6	6	7		13
5					0	0	0	0		17
6						0	1	1		4
7							0	0	0	2
	Número de varroas mortas antes de aplicar o óleo									

Anexo 2.7: Taxas de sobrevivência no ensaio da volatilização.

Tempo	0	15	30	45	60	75	90	105	140
caixa 1	1	1	1	1	1	1	0,89	0,89	
caixa 2	1	1	1	0,86	0,86	0,71	0,71		
caixa 3	1	1	1	0,71	0,57	0,43			
caixa 4	1	0,62	0,54	0,54	0,46				
caixa 5	1	1	1	1					
caixa 6	1	0,75	0,75						
caixa 7	1	1	1	1	1	1	1	1	1



Anexo 2.8: Taxa de sobrevivência da varroa ao longo do tempo em cada uma das caixas, após exposição com o óleo essencial.

Anexo 2.9: As médias e medianas para a sobrevivência da varroa no tempo para cada tratamento.

Means and Medians for Survival Time

Tratamento caixa	Meana				Median			
	Estimate	Std. Error	95% Confidence Interval		Estimate	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound			Lower Bound	Upper Bound
1,00	103,333	2,222	98,978	107,689
2,00	81,429	5,952	69,763	93,094
3,00	64,286	5,765	52,986	75,585	75,000	19,640	36,506	113,494
4,00	40,385	6,448	27,746	53,023	60,000	.	.	.
6,00	26,250	3,248	19,885	32,615
Overall	79,370	5,756	68,088	90,652	105,000	.	.	.

Anexo 2.10 Estatística do teste de Log-Rank e a comparação entre tratamentos, para o ensaio de volatilização.

Pairwise Comparisons

Tratamentocaix		1,00		2,00		3,00		4,00		6,00	
	a	Chi-Square	Sig.	Chi-Square	Sig.	Chi-Square	Sig.	Chi-Square	Sig.	Chi-Square	Sig.
Log Rank	1,00										
	2,00	,906	,341								
(Mantel	3,00	6,710	,010	1,185	,276						
-Cox)	4,00	6,679	,010	2,883	,089	,538	,463				
	6,00	2,250	,134	1,750	,186	1,750	,186	,498	,480		

Anexo 2.11: Grupos e a quantidade de encapsulado por grupo.

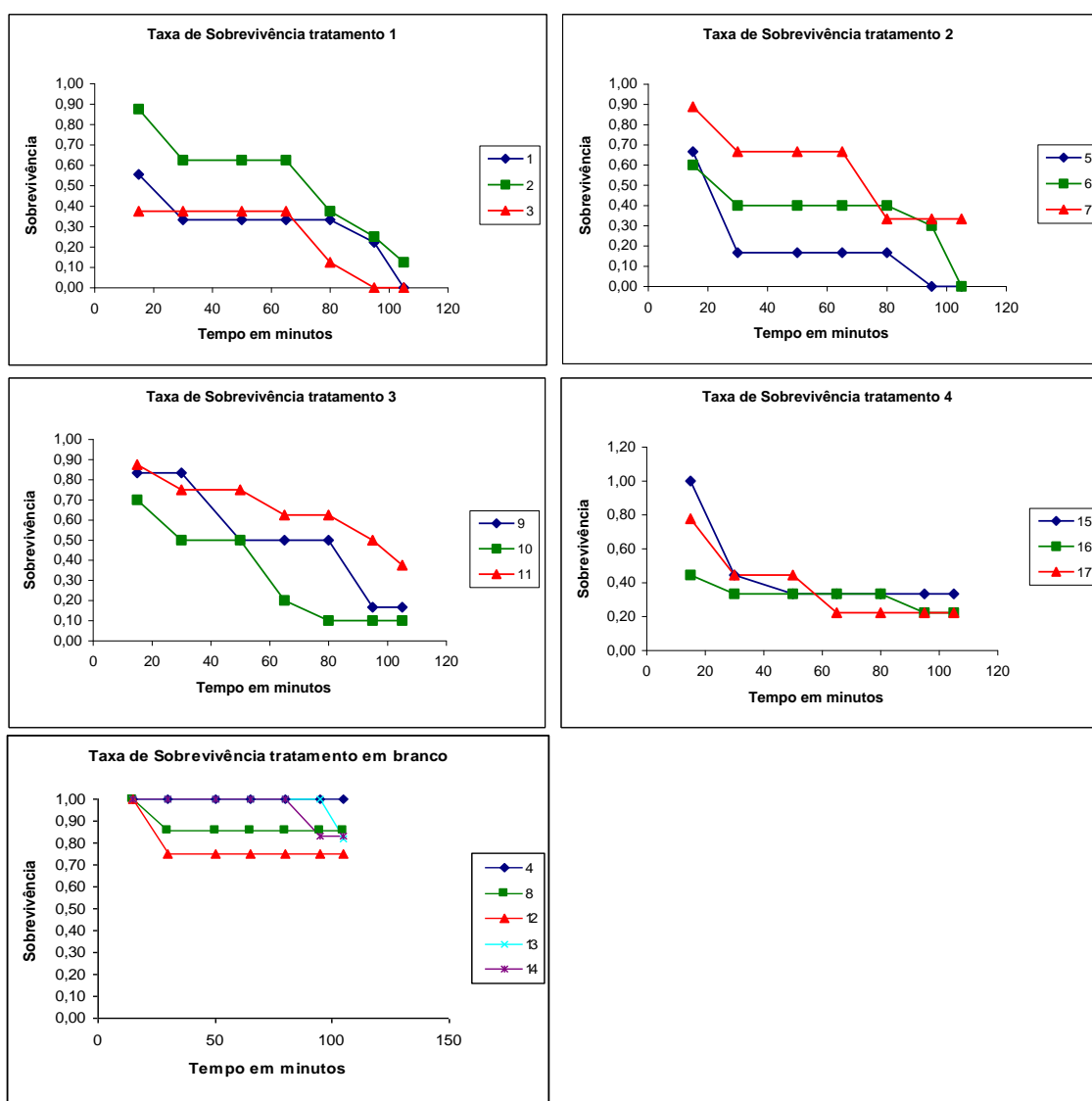
Grupo	Quantidade
1	2g
2	1g
3	0,25g
4	0,5g
0	Branco

Anexo 2.12: Resultados obtidos no ensaio com o óleo essencial encapsulado, número de varroas mortas ao longo do tempo, em cada grupo.

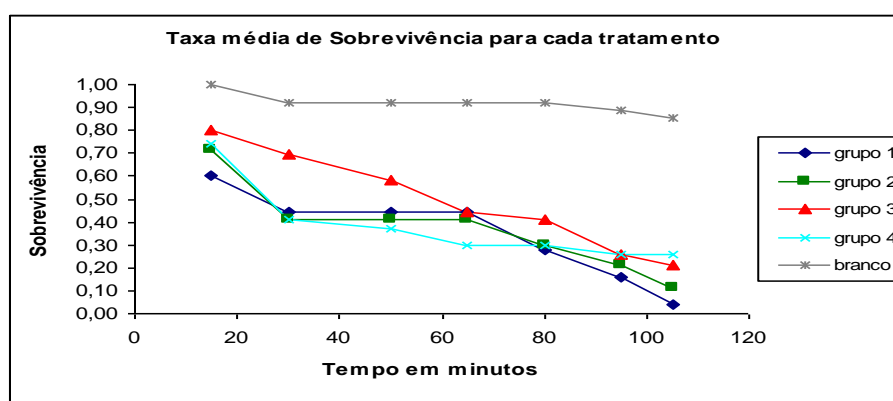
		Tempo Minutos							
Quantidade	Número	15	30	50	65	80	95	105	Total
2	1	4	7	7	7	6	7	9	9
	2	1	5	5	3	5	6	7	8
	3	5	8	8	5	7	8	8	8
1	5	2	5	6	5	5	6	6	6
	6	4	7	6	7	6	7	10	10
	7	1	3	5	3	8	6	6	9
0,25	9	4	1	4	4	3	5	5	6
	10	3	7	5	8	9	9	9	10
	11	1	2	2	4	3	4	5	8
0,5	15	0	5	6	6	6	6	6	9
	16	5	6	8	6	6	7	7	9
	17	2	5	5	7	7	7	7	9
Branco	4	0	0	0	0	0	0	0	9
	8	1	1	1	1	1	1	1	7
	12	1	1	1	1	1	1	1	4
	13	0	0	0	0	0	0	2	11
	14	0	0	0	0	0	3	3	18

Anexo 2.13: Taxa de sobrevivência da varroa por caixa, ao longo do tempo.

Taxa de Sobrevivência							
Número	Tempo Minutos						
	15	30	50	65	80	95	105
1	0,56	0,22	0,22	0,22	0,33	0,22	0,00
2	0,88	0,38	0,38	0,63	0,38	0,25	0,13
3	0,38	0,00	0,00	0,38	0,13	0,00	0,00
5	0,67	0,17	0,00	0,17	0,17	0,00	0,00
6	0,60	0,30	0,40	0,30	0,40	0,30	0,00
7	0,89	0,67	0,44	0,67	0,11	0,33	0,33
9	0,33	0,83	0,33	0,33	0,50	0,17	0,17
10	0,70	0,30	0,50	0,20	0,10	0,10	0,10
11	0,88	0,75	0,75	0,50	0,63	0,50	0,38
15	1,00	0,44	0,33	0,33	0,33	0,33	0,33
16	0,44	0,33	0,11	0,33	0,33	0,22	0,22
17	0,78	0,44	0,44	0,22	0,22	0,22	0,22
4	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
8	0,86	0,86	0,86	0,86	0,86	0,86	0,86
12	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75
13	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,82
14	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,83	0,83



Anexos 2.14: Taxas de sobrevivência ao longo do tempo para cada grupo.



Anexos 2.15: Taxa média de sobrevivência da varroa para cada um dos tratamentos, ao longo do tempo.

Anexos 2.16: Medias e Medianas para a sobrevivência da varroa no tempo para cada tratamento, no ensaio com o óleo essencial encapsulado.

Means and Medians for Survival Time

Tratamento	Meana				Median			
	Estimate	Std. Error	95% Confidence Interval		Estimate	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound			Lower Bound	Upper Bound
,00	113,378	1,003	111,412	115,345
1,00	53,400	8,186	37,356	69,444	30,000	9,307	11,758	48,242
2,00	59,615	8,370	43,211	76,020	30,000	16,523	,000	62,385
3,00	65,833	7,955	50,241	81,425	65,000	9,057	47,248	82,752
4,00	30,833	6,446	18,199	43,467	15,000	.	.	.
Overall	70,885	3,804	63,429	78,340	80,000	8,550	63,241	96,759